



## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ: (ไทย) การศึกษาโครงสร้างและสมบัติในการใช้ไคตินของเอนไซม์ไคติเนส เอ กลายพันธุ์  
จากเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio carchariae*  
(English) Investigation of structural and enzymatic properties in chitin utilization of  
chitinase A mutants from *Vibrio carchariae*

โดย

รองศาสตราจารย์ ดร. วิภา สุจินต์

สาขาวิชาชีวเคมี สำนักวิทยาศาสตร์  
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี  
จังหวัดนครราชสีมา

30 มิถุนายน พ.ศ. 2552

สัญญาเลขที่ RMU4980028

## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ: (ไทย) การศึกษาโครงสร้างและสมบัติในการใช้ไคตินของเอนไซม์ไคติเนสเอกลายพันธุ์

จากเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio carchariae*

(English) Investigation of structural and enzymatic properties in chitin utilization of  
chitinase A mutants from *Vibrio carchariae*

โดย

รองศาสตราจารย์ ดร. วิภา สุจินต์

สาขาวิชาชีวเคมี สำนักวิชาวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

จังหวัดนครราชสีมา

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา

และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

## กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบขอบคุณสำนักงานกองทุนส่งเสริมงานวิจัยแห่งชาติ (สกว) และสำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษาแห่งชาติ (สกอ) ที่ได้สนับสนุนงบประมาณในงานวิจัยชิ้นนี้ตลอดระยะเวลา 3 ปี และขอขอบคุณ PD.Dr. Heino Prinz จาก Max-Planck Institute for Molecular Physiology เมือง Dortmund ประเทศเยอรมันนี ที่ให้ความร่วมมือในการใช้เครื่องมือวิเคราะห์ HPLC-Electrospray MS เป็นอย่างดียิ่ง

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีที่ให้ทุนสนับสนุนเพิ่มเติมและอุปกรณ์เครื่องมือในห้องปฏิบัติการชีวเคมี ทำให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

รองศาสตราจารย์ ดร. วิภา สุจินต์

อาจารย์สาขาวิชาชีวเคมี สำนักวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

## บทคัดย่อ

เอนไซม์ไคติเนส เอ จากเชื้อแบคทีเรียในทะเล *Vibrio harveyi* เป็นเอนไซม์ที่สลายไคตินให้เป็นน้ำตาลไคโตโอลิโกแซคคาไรด์และไคโตโบอิสเป็นผลิตภัณฑ์หลัก งานวิจัยก่อนหน้านี้ได้ทำการโคลนยีนไคติเนส เอ และได้ศึกษาคุณสมบัติทางเอนไซม์ไคติเนส เอ งานวิจัยนี้อธิบายบทบาทของกรดอะมิโนวงแหวนที่บริเวณจับกับสับสเตรทและกรดอะมิโนที่ผิวของเอนไซม์ในการสลายสับสเตรทไคตินและไคโตโอลิโกแซคคาไรด์โดยทำการเปลี่ยนกรดอะมิโน Trp70 Trp168 Tyr171 Trp231 Tyr245 Trp275 Trp397 และ Trp570 การทดสอบหาค่า specific hydrolyzing activity ของไคติเนสกลายพันธุ์ พบว่ามีเอนไซม์กลายพันธุ์ตัวเดียวคือ W397F ที่ให้ค่าแอกติวิตีสูงกว่าเอนไซม์ดั้งเดิมส่วนเอนไซม์กลายพันธุ์อื่นมีค่าแอกติวิตีลดลงอย่างมาก การวิเคราะห์หาน้ำตาลผลิตภัณฑ์ที่สร้างขึ้นโดยวิธี TLC พบว่าเมื่อกรดอะมิโนที่ตำแหน่งรีดิวซ์ Trp275 ถูกเปลี่ยนเป็น Gly และ Trp397 เปลี่ยนเป็น Phe ทำให้รูปแบบการสลายน้ำตาลสายสั้นเปลี่ยนไปอย่างสิ้นเชิงแสดงว่ากรดอะมิโนทั้งสองน่าจะมีความสำคัญต่อการเลือกจับของน้ำตาลไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ การศึกษาการจับกับไคตินและการทดลองทางจลนพลศาสตร์แสดงให้เห็นว่า Trp70 ซึ่งพบอยู่ที่ผิวที่ปลายด้านเอ็นของโดเมนจับไคตินมีความสำคัญมากต่อการจับกับไคตินสายยาว การตรวจหารูปแบบการจับของสับสเตรทโดยเทคนิค HPLC MS พบว่า  $\text{NAG}_6$  ซอบบริเวณจับ -2 ถึง +2 มากกว่าบริเวณจับ -3 ถึง +2 ส่วน  $\text{NAG}_5$  จะจับกับบริเวณจับ -2 ถึง +2 อย่างเดียวในขณะที่ crystalline  $\alpha$  chitin จะเริ่มจับที่บริเวณจับได้หลายตำแหน่งทำให้สลายตัวกลางไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ได้หลายชนิดซึ่งตัวกลางเหล่านี้จะจับกับตำแหน่ง -2 ถึง +2 เป็นหลัก นอกจากนี้ยังพบว่าไคติเนสกลายพันธุ์ W275G และ W397F มีความชอบต่อสับสเตรทชนิด  $\beta$  มากกว่าสับสเตรทชนิด  $\alpha$  การศึกษาโครงสร้างผลึกของเอนไซม์ไคติเนสดั้งเดิมและเอนไซม์กลายพันธุ์ที่ไม่เร่งปฏิกิริยา E315M ในสถานะที่ไม่มีและมีสับสเตรทให้ความละเอียดของโครงสร้างสูงในช่วง 2.0 – 1.7 อังสตรอม โครงสร้างโดยรวมของเอนไซม์ไคติเนสประกอบด้วย 3 โดเมนแยกกันคือ i) โดเมนจับไคตินที่ปลายด้านเอ็น ii) โดเมนเร่งปฏิกิริยา  $(\alpha/\beta)_8$  TIM-barrel และ iii) โดเมนแทรกขนาดเล็ก  $(\alpha+\beta)$  บริเวณเร่งของเอนไซม์มีลักษณะเป็นร่องยาวลึกประกอบด้วยบริเวณจับหกบริเวณคือ  $(-4)(-3)(-2)(-1)(+1)(+2)$  โครงสร้างเชิงซ้อนของ E315M กับไคโตโอลิโกแซคคาไรด์แสดงโครงรูปตรงของน้ำตาล  $\text{NAG}_5$  แต่โครงรูปงอของน้ำตาล  $\text{NAG}_6$  ข้อมูลโครงสร้างที่ได้ให้หลักฐานว่าน้ำตาลที่จับอยู่มีการเปลี่ยนโครงรูปก่อนถูกสลายซึ่งน่าจะเกิดผ่าน 'slide-and-bend' mechanism

## ABSTRACT

Chitinase A from a marine bacterium *Vibrio harveyi* is an enzyme that degrades chitin to chitooligosaccharides, yielding chitobiose as the major product. The gene encodes chitinase A was previously cloned and its enzymatic properties characterized. This study describes the functional roles of the aromatic residues located at the substrate binding cleft and the surface-exposed residues in chitin and chitooligosaccharide hydrolyses. Point mutations of Trp70, Trp168, Tyr171, Trp231, Tyr245, Trp275, Trp397, and Trp570, were generated. Investigation of specific hydrolyzing activity indicated that only mutant W397F had enhanced activity, while other mutants showed a significant loss of the activity. TLC analysis of product formation showed a complete change in the hydrolytic patterns of short-chain substrates when the reducing end residues Trp275 was mutated Gly and Trp397 to Phe, suggesting that both residues were crucial for the binding selectivity of chitinoligosaccharides. Chitin binding assay and kinetic experiments suggested that Trp70, which is located on the surface at the *N*-terminal end of the chitin binding domain, was the essential binding residue for a long-chain chitin. Assessment of substrate binding modes by HPLC MS revealed that NAG<sub>6</sub> preferred subsites -2 to +2 over subsites -3 to +2 and NAG<sub>5</sub> only bound to subsites -2 to +2. Crystalline  $\alpha$  chitin initially occupied various subsites, generating various chitooligosaccharide intermediates which later interacted mainly to subsites -2 to +2. In addition, mutants W275G and W397F preferred  $\beta$  substrates over  $\alpha$  substrates. Four crystal structures of chitinase A and its catalytically inactive mutant (E315M) were solved in the absence and presence of substrates to high resolutions of 2.0 – 1.7 Å. The overall structure of chitinase A comprises three distinct domains: i) the *N*-terminal chitin-binding domain; ii) the main catalytic ( $\alpha/\beta$ )<sub>8</sub> TIM-barrel domain; and iii) the small ( $\alpha+\beta$ ) insertion domain. The catalytic cleft of chitinase A has a long, deep groove, which contains six binding subsites (-4)(-3)(-2)(-1)(+1)(+2). Structures of E315M-chitooligosaccharide complexes display a linear conformation of NAG<sub>5</sub>, but a bent conformation of NAG<sub>6</sub>. The crystallographic data provides evidence that the interacting sugars undergo conformational changes prior to hydrolysis most likely via the 'slide-and-bend' mechanism.

## สัญญาเลขที่ RMU4980028

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) การศึกษาโครงสร้างและสมบัติในการใช้ไคตินของเอนไซม์ไคติเนส

เอ กลายพันธุ์ จากเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio carchariae*

(ภาษาอังกฤษ) Investigation of structural and enzymatic properties in chitin

utilization of chitinase A mutants from *Vibrio carchariae*

### หน้าสรุปโครงการ (Executive Summary)

ชื่อหัวหน้าโครงการ รองศาสตราจารย์ ดร. วิภา สุจินต์

หน่วยงานที่สังกัด สาขาวิชาชีวเคมี สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อ.เมือง

จ. นครราชสีมา 30000 โทร 044 22 3968 แฟกซ์ 044 22 4193/044 22 4185

สาขาวิชาที่ทำการวิจัย ชีวเคมีที่เกี่ยวข้องกับการแพทย์และการเกษตร

คำสำคัญ chitinase A mutant/*Vibrio carchariae*/site-directed mutagenesis/chitin hydrolysis

ระยะเวลาดำเนินงาน 3 ปี

### 1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา

กากไคตินจัดเป็น by-product ของอุตสาหกรรมแปรรูปอาหารทะเลส่งออกนอกประเทศของประเทศไทย กากไคตินที่ผลิตได้นี้มีปริมาณมากและก่อให้เกิดปัญหาต่อสิ่งแวดล้อมเนื่องจากไม่สามารถถูกย่อยสลายได้โดยกระบวนการตามธรรมชาติ ไคตินเองมีมูลค่าทางเศรษฐกิจต่ำแต่ผลผลิตที่ได้จากการสลายไคตินคือไคโตโอลิโกแซคคาไรด์หรืออนุพันธ์ไคตินและไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ เช่น กลูโคซามีน มีมูลค่าทางพาณิชย์สูงเนื่องจากมีคุณสมบัติเป็นทั้งยารักษาโรค เช่น โรคไขข้อเสื่อม และใช้เป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์เสริมความงาม (cosmetics) เป็นต้น *Vibrio carchariae* เป็นแบคทีเรียในทะเลที่ผลิตไคติเนส เอ ปริมาณมากจึงเป็นเชื้อที่เหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นเอนไซม์สลายไคตินในปริมาณมาก ผู้วิจัยได้ทำการแยกและโคลนยีนของไคติเนสออกจากเชื้อนี้ได้ หลังจากนั้นนำยีนที่ได้ไปทำการแสดงออกโดยให้ผลิตรีคอมบิแนนท์ไคติเนสใน *E. coli* ได้สำเร็จ งานวิจัยที่นำเสนอนี้ต้องการสร้างไคติเนสกลายพันธุ์โดยเทคนิค site-directed mutagenesis เพื่อศึกษาบทบาทของกรดอะมิโนต่าง ๆ ที่บริเวณเร่งและบริเวณผิวของเอนไซม์ในการเร่งปฏิกิริยาหรือในการจับกับสับสเตรทชนิดต่าง ๆ การศึกษาโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ไคติเนสที่มีและไม่มีสับสเตรทจับอยู่จะทำให้เข้าใจกลไกการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ งานวิจัยนี้ถือเป็นงานวิจัยพื้นฐานระดับโมเลกุลโดยมีจุดมุ่งหมายระยะยาวที่จะประยุกต์ใช้เทคโนโลยีทางเอนไซม์

ในการแก้ปัญหาสิ่งแวดล้อมและการเปลี่ยนภาคชีวิตที่มีจำนวนมากในธรรมชาติให้เกิดประโยชน์ทางการเกษตร การแพทย์และอุตสาหกรรม

## 2. วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อเปลี่ยนชนิดของกรดอะมิโนในวงแหวนที่บริเวณเร่ง และที่บริเวณผิวของเอนไซม์ไคติเนสเอ จากเชื้อแบคทีเรีย *V. carchariae* โดยเทคนิค site-directed mutagenesis
2. เพื่อทำการผลิตโปรตีนกลายพันธุ์ในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ M15 ให้ปริมาณมากและการทำบริสุทธิ์โดยเทคนิคทางโครมาโตกราฟี
3. เพื่อศึกษาหน้าที่และโครงสร้างของเอนไซม์กลายพันธุ์เทียบกับ wild-type เพื่อการเข้าใจกลไกการสลายไคติน

## 3. ระเบียบวิธีวิจัย

1. ตรวจสอบเอกสารและค้นคว้าหาข้อมูลที่เกี่ยวข้องจากห้องสมุดมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีและห้องสมุดมหาวิทยาลัยที่มีเอกสารอ้างอิงที่เกี่ยวข้อง หรือการค้นหากจากอินเทอร์เน็ต
2. การจัดซื้อสารเคมีแล้วสต็อกเพื่อเริ่มทำงานวิจัย โดยงานวิจัยเริ่มที่ห้องปฏิบัติการวิจัยของสาขาวิชาชีวเคมี อาคารศูนย์เครื่องมือรวม F1 และ F2 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
3. การออกแบบและสังเคราะห์ oligonucleotides ที่มีส่วนของยีนที่ถอดรหัสกรดอะมิโนที่เปลี่ยนไป โดยกรดอะมิโนที่จะเปลี่ยนเป็นกรดอะมิโนที่เกี่ยวข้องกับการจับของเอนไซม์กับไคตินที่บริเวณเร่งและบริเวณ chitin binding domain โดยสังเคราะห์ oligonucleotides จาก BioServiceUnit ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ
4. การสร้างไคติเนสกลายพันธุ์ (chitinase mutants) โดยใช้เทคนิค PCR ในการทำ site-directed mutagenesis ขั้นตอนนี้ดำเนินการที่ห้องปฏิบัติการวิจัยของสาขาวิชาชีวเคมี อาคารศูนย์เครื่องมือรวม F1 และ F2 ม.เทคโนโลยีสุรนารี
5. การโคลนยีนที่กลายพันธุ์และการศึกษาการแสดงออกของยีนใน *E. coli* สายพันธุ์ M15 และการทำบริสุทธิ์โดยวิธีทางโครมาโตกราฟี ดำเนินการที่ห้องปฏิบัติการวิจัยของสาขาวิชาชีวเคมี อาคารศูนย์เครื่องมือรวม F1 และ F2 ม.เทคโนโลยีสุรนารี
6. การศึกษาโครงสร้างปฐมภูมิและทุติยภูมิของเอนไซม์กลายพันธุ์เพื่อยืนยันว่าโปรตีนที่ผลิตโดย *E. coli* มีการ folding ที่ถูกต้อง ดำเนินการที่ห้องปฏิบัติการวิจัยของสาขาวิชาชีวเคมี อาคารศูนย์เครื่องมือรวม F1 และ F2 ม.เทคโนโลยีสุรนารี
7. การศึกษาทางจุลศาสตร์เพื่อหาความจำเพาะต่อสับสเตรทของ chitinase mutant ต่าง ๆ เทียบกับเอนไซม์ wild-type ดำเนินการที่ห้องปฏิบัติการวิจัยของสาขาวิชาชีวเคมี อาคารศูนย์เครื่องมือรวม F1 และ F2 ม.เทคโนโลยีสุรนารี

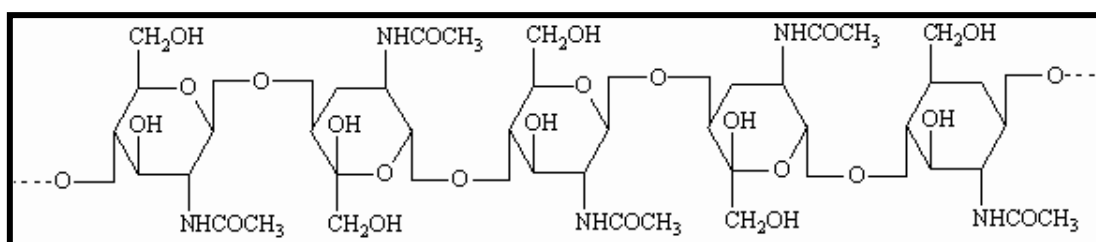
8. การเปรียบเทียบความสามารถในการจับของเอนไซม์กับสับสเตรทชนิดต่าง ๆ โดยเทคนิค chitin binding assay ควบคู่การศึกษาการสลายสับสเตรทด้วยการวิเคราะห์ด้วย thin layer chromatography โดยทำการทดลองที่ห้องปฏิบัติการวิจัยของสาขาวิชาชีวเคมี อาคารศูนย์เครื่องมือรวม F1 และ F2 ม.เทคโนโลยีสุรนารี
9. ศึกษากลไกการจับและการเลือกใช้สับสเตรทของเอนไซม์ไคตินเนสโดยเทคนิค HPLC MS ทำที่ Max-Planck Institute for Molecular Physiology, Dortmund, Germany
10. การศึกษาโครงสร้างผลึกของเอนไซม์ไคตินเนส เอ และโครงสร้างเชิงซ้อนของไคตินสกลายพันธุ์กับสับสเตรท ขั้นตอนนี้ทำการทดลองที่ห้องปฏิบัติการวิจัยของ Assoc. Prof. Robert Charles Robinson ที่ Institute of Cell and Molecular Biology, Singapore และที่อาคารศูนย์เครื่องมือรวม F1 และ F2 ม.เทคโนโลยีสุรนารี
11. การรวบรวมผลการทดลอง การแปลผล และการตีพิมพ์ในวารสารวิจัยระดับนานาชาติ รวมถึงการเขียนรายงานฉบับสมบูรณ์ ทำที่สาขาวิชาชีวเคมี ม.เทคโนโลยีสุรนารี



## เนื้อหางานวิจัย

### 1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ไคติน (chitin) เป็นชีวโพลิเมอร์สายตรงประกอบด้วยน้ำตาลหน่วยย่อย ๆ ของ *N*-acetyl glucosamine มาเรียงต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิกแบบ  $\beta 1 \rightarrow 4$  ดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 โครงสร้างของไคตินโพลิเมอร์

ไคตินจัดเป็นองค์ประกอบโครงสร้างภายนอกที่สำคัญของสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำต่าง ๆ ได้แก่ กุ้ง ปู แมลง และองค์ประกอบหลักของเส้นใยเชื้อราเกือบทุกชนิด ไคตินเป็นชีวโพลิเมอร์ที่มีปริมาณมากที่สุดเป็นอันดับที่สองรองจากเซลลูโลสโดยมีการประมาณปริมาณของไคตินที่มีการผลิตในโลกนี้มากถึง  $10^{10}$  ถึง  $10^{11}$  ตันต่อปี (Gooday, 1994) ดังนั้นจึงได้มีความสนใจในการศึกษาวิจัยเพื่อนำไคตินไปใช้ให้เกิดประโยชน์ทั้งทางด้านการแพทย์ การเกษตรกรรม การโภชนาการ การเกษตรกรรม การบำบัดน้ำเสีย และอื่น ๆ เนื่องจากไคตินไม่สามารถย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ ดังนั้น ไคตินจึงจัดเป็นกากของเสียปริมาณมากที่ถูกปล่อยจากโรงงานอุตสาหกรรมการผลิตและแปรรูปอาหาร เช่น อาหารทะเลแช่แข็ง อาหารทะเลอัดกระป๋อง เป็นต้น กากของเสียนี้ได้ส่งผลให้เกิดปัญหามลภาวะกับสิ่งแวดล้อมข้างเคียงเป็นอย่างมากในปัจจุบัน ดังนั้นจึงมีงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาการย่อยสลายไคตินเพื่อนำผลิตผลที่ได้ไปใช้ให้เกิดประโยชน์ เช่น เป็นแหล่งอาหารในภาคเกษตรกรรมการเลี้ยงสัตว์ เช่น กุ้ง ปลา หมู ในขณะนี้การย่อยสลายไคตินโดยใช้เอนไซม์เป็นที่ได้รับความสนใจเนื่องจากข้อดีหลายประการเปรียบเทียบกับกรรมวิธีทางเคมี ทั้งในแง่ของการประหยัดค่าใช้จ่าย ปฏิกริยาเกิดขึ้นได้รวดเร็วและสมบูรณ์ และไม่ก่อให้เกิดสารพิษตกค้างหลังปฏิกิริยาการย่อยสลาย

ในธรรมชาติการย่อยสลายไคตินอย่างสมบูรณ์ประกอบด้วยการทำงานของเอนไซม์สองชนิด ขั้นตอนหลัก ๆ คือไคตินโพลิเมอร์ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ไคตินเนส (EC3.2.1.14) ให้เป็นน้ำตาลสายสั้นๆ หรือไคตินโอลิโกเมอร์ให้ผลิตผลสุดท้ายเป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่ ขั้นตอนต่อมาคือการย่อยน้ำตาลโมเลกุลคู่ให้เป็น

น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวด้วยเอนไซม์บีต้าเอนอะซิทิลกลูโคซามิเนส หรือโคโตไบเอส ( $\beta$ -N-acetyl glucosaminidase/chitinase) (EC 3.2.1.29) (Davis & Eveleigh, 1984)

เอนไซม์ไคตินเนสพบในสิ่งมีชีวิตหลากหลายตั้งแต่สิ่งมีชีวิตชั้นต่ำ เช่น เชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังต่าง ๆ ไปจนถึงสิ่งมีชีวิตชั้นสูงขึ้นไปเช่น ที่ส่วนต่าง ๆ ของพืช ระบบทางเดินอาหารของสัตว์ทะเล และสัตว์เคี้ยวเอื้อง หน้าที่ของเอนไซม์นี้ในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดมีแตกต่างกันไป เช่น เกี่ยวข้องในกระบวนการแบ่งเซลล์และการเปลี่ยนแปลงสัณฐานของเส้นใยของเชื้อรา (Papavizas, 1985; Cabib, 1987; Kuranda & Robbins, 1991) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาพบว่าเอนไซม์นี้มีส่วนในระบบการป้องกันการรุกรานของปรสิตในสิ่งมีชีวิตที่เชื้อราไปอาศัยอยู่ (Srivastava et al. 1985; Sivan & Chet 1989) มีส่วนช่วยในการย่อยสลายอาหารในระบบย่อยอาหารของทั้งสัตว์ที่มีและไม่มีกระดูกสันหลัง เช่น แมลงและปลาชนิดต่างๆ (Gooday, 1999) นอกจากนี้เอนไซม์นี้ยังทำหน้าที่ในการย่อยสลายคิวติเคิล (cuticles) เก้าที่ปีกแมลงเพื่อสร้างคิวติเคิลใหม่ขึ้นมา (Spindler-Barth, 1993) ในพืชเอนไซม์นี้มีส่วนในกลไกการต่อต้านการติดเชื้อราของพืช (Boller et al., 1983; Pleban et al., 1997) และกระบวนการสร้างเซลล์ (embryogenesis) ของต้นอ่อนพืช (de Jong, 1992) ส่วนในคนพบว่า acidic chitinase มีส่วนเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการเกิดโรคภูมิแพ้ได้ (Wills-Karp & Karp, 2004)

สามารถจำแนกเอนไซม์ไคตินเนสออกเป็น 2 กลุ่มหลักความเหมือนของลำดับของกรดอะมิโน (Henrissat & Bairoch, 1993) คือ กลุ่มที่ 1 ไคตินเนสแฟมิลี 18 พบในสิ่งมีชีวิตหลากหลายตั้งแต่แบคทีเรียไปจนถึงพืชและสัตว์ เอนไซม์ในกลุ่มนี้มีลักษณะเชิงโครงสร้างที่สำคัญคือมีบริเวณเร่งประกอบด้วย 2 โดเมนย่อย (Cat I และ Cat II) มาสร้างโครงสร้าง ( $\alpha/\beta$ )<sub>8</sub> TIM barrel มีกลไกการเร่งปฏิกิริยาแบบ substrate-assisted mechanism (Papanikolaou et al., 2001; Bortone et al., 2002; Sasaki et al., 2002) ส่วนกลุ่มที่ 2 คือไคตินเนสแฟมิลี 19 พบเฉพาะในพืชและแบคทีเรียแกรมบวก *Streptomyces* (Cohen-Kupiec & Chet, 1998; Ohno et al., 1996) ลักษณะของเอนไซม์ในกลุ่มนี้คือมีบริเวณเร่งเป็นแบบ bilobal  $\alpha+\beta$  folding motif มีกลไกการเร่งปฏิกิริยาแบบ inversion hydrolytic mechanism (Robertus & Monzingo, 1999)

ได้มีการศึกษาเอนไซม์ไคตินเนสในแฟมิลี 18 ทั้งทางด้านชีวเคมีและชีววิทยาระดับโมเลกุล มีการใช้เทคนิค site-directed mutagenesis ควบคู่กับการศึกษาโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ ตัวอย่างเช่น ไคตินเนส เอ จาก *Serratia marcescens* (Perrakis et al., 1994) ไคตินเนส A1 (ChBD) จาก *Bacillus circulans* (Ikegami et al., 2000) ไคตินเนสจากเชื้อรา *Coccidioides immitis* (Hollis et al., 2000) และไคตินเนสจาก *Hevamine* (Terwisscha van Scheltinga et al., 1996) เป้าหมายของการศึกษาคือเพื่อการเข้าใจกลไกการจับและการสลายไคตินของเอนไซม์ไคตินเนสโดยละเอียด หรือเพื่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเอนไซม์ให้มีคุณสมบัติที่เหมาะสมในการสลายไคตินที่จะนำไปประยุกต์ในแง่การรักษาโรคเช่นการพัฒนายาวัคซีนป้องกันโรคติดเชื้อรา หรือทางการเกษตร เช่น การพัฒนาปรับปรุงสายพันธุ์พืชเศรษฐกิจต่างๆ ให้มีคุณสมบัติในการต่อต้านโรคราต่าง ๆ ส่วนทางเทคโนโลยีชีวภาพมีการใช้เอนไซม์ในการกำจัดกากของ

เสียไคตินและนำผลผลิตจากการย่อยไคตินไปใช้ประโยชน์ทางด้านการแพทย์และอุตสาหกรรม cosmetics เป็นต้น

เชื้อแบคทีเรียในทะเล (marine bacteria) ในแฟมิลี *Vibrionaceae* จัดเป็นแหล่งเอนไซม์ไคติเนส เอ ซึ่งเป็นสมาชิกของไคติเนสแฟมิลี 18 ที่สำคัญ เนื่องจากแบคทีเรียในกลุ่มนี้ผลิตเอนไซม์ออกนอกเซลล์เพื่อย่อยสลายไคตินที่เป็นองค์ประกอบของสิ่งมีชีวิตในทะเลเช่น สาหร่ายสีเขียวและไดอะตอม ให้เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนของเซลล์ (Yu et al., 1991; Montgomery & Kirchman, 1993; Bassler et al., 1991) ดังนั้นเอนไซม์ไคติเนสที่ผลิตจากแบคทีเรียในกลุ่มนี้จึงมีความเหมาะสมในการนำมาประยุกต์ใช้ในกระบวนการย่อยสลายกากไคตินโดยกระบวนการทางชีวภาพ (bioconversion process) การศึกษาก่อนหน้านี้โดยผู้วิจัยเองพบว่าเชื้อแบคทีเรียในทะเล *Vibrio carchariae* ผลิตเอนไซม์ไคติเนส เอ เป็นหลัก (Suginta et al., 2000; Suginta 2007) เอนไซม์ไคติเนส เอ ประกอบด้วยหน่วยย่อยเดี่ยวมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 63 kDa ที่คุณสมบัติเป็นเอนโดไคติเนสที่สามารถสลายพันธะไกลโคซิดิกที่ตำแหน่งต่าง ๆ ภายในสายไคตินโพลีเมอร์ได้ผลิตผลที่เป็นไคโตโอลิโกเมอร์มีความยาวตั้งแต่ 2-6 หน่วย แต่ผลผลิตของการย่อยสุดท้ายคือไคโตไบโอส จากการศึกษาคุณสมบัติทางจุลศาสตร์ของเอนไซม์พบว่าเอนไซม์มีความชอบ (affinity) ต่อไคโตโอลิโกแซคคารไรด์มากขึ้นเมื่อสายของไคโตโอลิโกเมอร์ยาวขึ้นซึ่งแสดงถึงโครงสร้างของบริเวณเร่งที่มีลักษณะเป็นแบบ multiple binding subsite (Suginta et al., 2004 and 2005) ได้มีการศึกษาจากเอนไซม์ไคติเนส เอ ของ *S. marcescens* ว่ากรดอะมิโนที่มีแขนข้างเป็นวงแหวนหลายตัวมีลักษณะ conserve ที่บริเวณเร่งของเอนไซม์ได้แก่ W168, Y170, W275, F397, Y418 และ W539 (Aronson et al., 2003) กรดอะมิโนเหล่านี้มีบทบาทในการทำหน้าที่สร้างสภาพที่ไม่ใช่ขั้วที่บริเวณเร่งทำให้เอนไซม์จับกับสับสเตรทได้ดี นอกจากนี้จากข้อมูลองค์ประกอบของโครงสร้างของโปรตีนไคติเนส เอ พบว่ามี chitin binding domain (ChBD) อยู่ทางด้านปลายด้านเอ็นของสายโพลีเพปไทด์ โดย ChBD จะมีกรดอะมิโนวงแหวนที่ conserve อยู่ 3 ตัวคือ W33, W69 และ W245 ซึ่งจัดเรียงตัวอยู่ในลักษณะที่จะช่วยตรึงสายไคตินโพลีเมอร์ให้อยู่ในตำแหน่งที่เหมาะสมที่จะถูกสลายโดยเอนไซม์ไคติเนส เอ จากข้อมูลนี้ ผู้วิจัยจึงมีความสนใจบทบาทของกรดอะมิโนวงแหวนที่บริเวณเร่งและบริเวณผิวของ ChBD ต่อการจับสายไคตินและอิทธิพลของกรดอะมิโนเหล่านี้ที่มีต่อเอนไซม์ในการสลายสับสเตรทไคตินและไคโตโอลิโกแซคคารไรด์ต่าง ๆ

## 2. วิธีการทดลอง

### 2.1. การกลายพันธุ์ การแสดงออกและการทำบริสุทธิ์

ทำการกลายพันธุ์โดยเทคนิค PCR site-directed mutagenesis โดยใช้ QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit (QIAGEN) และใช้ wild-type *chitinase A* DNA ที่โคลนอยู่ใน pQE60 expression vector เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ ทำการเปลี่ยนกรดอะมิโนเพื่อสร้างโปรตีนกลายพันธุ์ชนิด single mutant ดังนี้ S33A/W, W70A, W168G, Y171G, W231A, Y245A/W, W275G, E315M/Q, D392K/N, W397F และ W570G ส่วน double mutant ได้แก่ W397F/W570G triple mutant ได้แก่

W397F/W570G/ W275G) และ quadruple mutant ได้แก่ W397F/W570G/W275G/Y171G ดังอธิบายโดย Suginta et al. (2007)

หลังจากทำการตรวจสอบความถูกต้องของกรดอะมิโนที่เปลี่ยนด้วยการทำ automated DNA sequencing (BSU, ประเทศไทย) และวิเคราะห์ข้อมูลของดีเอ็นเอด้วยโปรแกรมใน DNASTAR package (DNASTAR, Inc., Madison, USA) ทำการ express รีคอมบิแนนท์โคติเนส เอ ดั้งเดิมและเอนไซม์กลายพันธุ์ในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ M15 ด้วยการเลี้ยงเซลล์ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดในอาหารเหลว LB/100 µg/ml ampicillin ที่ 25 °C จนได้ OD<sub>600</sub> ประมาณ 0.6 ทำการ induce เซลล์ด้วย 0.5 mM isopropyl thio-β-D-galactoside (IPTG) ที่ 25 °C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง หลังจากนั้นปั่นเก็บเซลล์ด้วยความเร็ว 4,500 g เป็นเวลา 30 นาที ที่ 4 °C ทำการละลายเซลล์ด้วย 40 ml ของ lysis buffer ที่ประกอบด้วย 20 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 mM phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF) และ 1.0 mg/ml lysozyme ต่อจากนั้นทำการสลายเซลล์ด้วยเทคนิค ultrasonication แล้วปั่นแยกเอาเศษเซลล์ออกด้วยความเร็ว 12,000 g เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำส่วนใสที่ได้หลังการปั่นตกตะกอนด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบจับจำเพาะโดยใช้ Ni-NTA agarose เป็นตัวจับ หลังจากล้างคอลัมน์ด้วย 5 mM imidazole ตามด้วย 10 mM imidazole ทำการชะเอาโปรตีนที่จับอยู่กับ Ni<sup>2+</sup> ด้วย 250 mM imidazole นำ fraction ที่ได้มาวิเคราะห์หาความบริสุทธิ์ด้วย 12% SDS-PAGE ตามวิธีของ Laemmli (Laemmli, 1970) ทำการรวม fraction ที่มีแถบโปรตีนโคติเนสที่ตำแหน่ง 63 kDa เข้าด้วยกันแล้วนำมาผ่าน membrane filtration (M<sub>r</sub> 10 000 cut-off, Vivascience AG, Hannover, Germany) เพื่อกำจัด imidazole และทำให้โปรตีนเข้มข้นขึ้น ทำการวัดความเข้มข้นของโปรตีนด้วยวิธี Bradford's (Bradford, 1974) แล้วนำโปรตีนมาศึกษาหน้าที่ โครงสร้าง หรือเก็บที่ -30°C ใน 15% กลีเซอรอล จนกว่าจะนำมาใช้งานต่อไป

## 2.2. การหาแอกติวิตี้ของเอนไซม์โคติเนส

หาแอกติวิตี้ของเอนไซม์โคติเนสโดยใช้ pNP-GlcNAc<sub>2</sub> เป็นสับสเตรท โดยทำปฏิกิริยาใน 96-well microtiter plate ทำปฏิกิริยา 100-µl ที่ประกอบด้วย 10 µl เอนไซม์ 500 µM pNP-(GlcNAc)<sub>2</sub> และ 100 mM sodium acetate buffer, pH 5.5 ที่ 37°C เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม 1.0 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (50 µl) แล้ววัดหาปริมาณ p-nitrophenol (pNP) ที่ค่าดูดกลืนแสง A<sub>405</sub> แล้วคำนวณความเข้มข้นของ pNP ด้วยกราฟมาตรฐานของ pNP ที่สร้างขึ้นในช่วง 0-30 nmol อีกวิธีหนึ่งคือการหาแอกติวิตี้ของเอนไซม์โดยวิธี reducing-sugar assay โดยทำปฏิกิริยา 500 µl ที่ประกอบด้วย 1% (w/v) colloidal chitin ใน 100 mM sodium acetate buffer, pH 5.5 และ 100 µg เอนไซม์ที่ 37°C ในเครื่องเขย่า Thermomixer comfort (Eppendorf AG, Hamburg, Germany) เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยการต้มที่ 100°C เป็นเวลา 5 นาที แล้วปั่นเอาส่วนของโคตินออกด้วยความเร็ว 5,000 g เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใส 200 µl มาทำปฏิกิริยาตรวจสอบน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DMAB assay ตามวิธีของ Bruce et al. (1995) แล้ววัดหาปริมาณน้ำตาลที่ทำปฏิกิริยาที่ค่าดูดกลืนแสง A<sub>585</sub> โดยใช้กราฟมาตรฐาน

ของ GlcNAc<sub>2</sub> ที่ช่วง 0-1.75  $\mu\text{mol}$  เพื่อหาความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ ส่วน crystalline  $\alpha$ -chitin ทำวิธีเดียวกันกับ colloidal chitin แต่ใช้ปริมาณเอนไซม์ในการทำปฏิกิริยาปริมาณ 400  $\mu\text{g}$  (Pantoom et al., 2008)

### 2.3. การวิเคราะห์หาน้ำตาลโดยเทคนิค TLC

ทำการศึกษาปฏิกิริยาการสลายโคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (NAG<sub>2</sub>-NAG<sub>6</sub>) ของเอนไซม์โคติเนสดั้งเดิมและโคติเนสกลายพันธุ์ในปริมาตร 20  $\mu\text{l}$  โดยปฏิกิริยาประกอบด้วย 100 mM sodium acetate buffer, pH 5.0 ที่มี 2.5 mM สับสเตรท และ 200 ng เอนไซม์บริสุทธิ์ ทำการบ่มปฏิกิริยาที่ 37 °C เป็นเวลา 0, 2.5, 5, 10, 30, 60 นาที และ 18 ชั่วโมง หลังจากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยการต้มที่ 100 °C เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นดูดสารละลายปริมาตร 5  $\mu\text{l}$  นำไปวิเคราะห์หาผลผลิตที่เกิดขึ้นด้วยวิธี thin layer chromatography โดยใช้แผ่น silica TLC plate ขนาด 5.0 ซม × 6.0 ซม เป็น stationary phase และมี mobile phase ที่ประกอบด้วย *n*-butanol:methanol: 30% ammonia solution:H<sub>2</sub>O (10:8:4:2) (v/v) หลังจากนั้นสเปรย์แผ่น TLC ด้วยสารละลาย aniline–diphenylamine reagent แล้วอบที่ 120 °C เป็นเวลา 5–10 นาที (Suginta et al., 2007)

### 2.4. การแยกและวิเคราะห์น้ำตาลโดยเทคนิค HPLC MS

ทำปฏิกิริยาการสลายน้ำตาล NAG<sub>5</sub> และ NAG<sub>6</sub> ในปริมาตร 50  $\mu\text{l}$  ที่ประกอบด้วย 500  $\mu\text{M}$  สับสเตรท 100 ng เอนไซม์ ในสารละลายบัฟเฟอร์ 0.1 M ammonium acetate buffer, pH 7.0 ที่อุณหภูมิ 0 °C เป็นเวลา 0, 3, 7, 20, 30, 60 และ 180 นาที ณ เวลาต่าง ๆ ทำการ aliquot สารละลาย 10  $\mu\text{l}$  ลงใน 200-  $\mu\text{l}$  vial แล้วนำไปแยกด้วย HPLC ที่ต่อกับเครื่อง ESI/MS โดยคอลัมน์ที่ใช้คือ Hypercarb®column (ThermoQuest, Thermo Electron Corporation, San Jose, CA, USA) ขนาด 150 × 2.1 mm 5  $\mu\text{m}$  ทำการ run คอลัมน์ที่อุณหภูมิ 10 °C ที่ flow rate เท่ากับ 0.4 ml/min ทำการชะน้ำตาลออกจากคอลัมน์ด้วย 5-70% gradient ของ acetonitrile ที่มี 0.1% formic acid คำนวณหา  $\beta/\alpha$  ratios จากพื้นที่ใต้ peak ของน้ำตาลต่าง ๆ ส่วนการวิเคราะห์หามวลในเครื่อง electrospray MS ใช้โหมด positive full scan โดยเลือกช่วงของ mass-to-charge ratio ( $m/z$ ) ระหว่าง 200-1,400 หลังจากนั้นทำการเพิ่ม signal-to-noise ratios ด้วยการเปลี่ยนโหมดในการวิเคราะห์เป็น single ion monitoring mode โดยเลือก  $m/z$  424.5 สำหรับ NAG<sub>2</sub>,  $m/z$  627.5 สำหรับ NAG<sub>3</sub>,  $m/z$  830.3 สำหรับ NAG<sub>4</sub>,  $m/z$  1034.16 สำหรับ NAG<sub>5</sub> สำหรับ  $m/z$  1236.3 สำหรับ NAG<sub>6</sub> (Suginta et al., 2009)

### 2.5. การทำ Chitin Binding Assay

ทำการศึกษาการจับกับสับสเตรทด้วยวิธี chitin binding assay ทำปฏิกิริยา (500  $\mu\text{l}$ ) ประกอบด้วย 1.0  $\mu\text{mol}$  เอนไซม์ และ 1.0 mg โคติน ใน 20 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0 ที่เวลาต่าง ๆ

กันคือ 0, 1.25, 2.5, 5, 10, 15, 20, 25, และ 30 นาที ที่  $0^{\circ}\text{C}$  เพื่อลดอัตราการสลายของสับสเตรทโดยเอนไซม์ ณ เวลาที่ต้องการทำการปั่นแยกเอนไซม์อิสระออกจากเอนไซม์ที่จับกับโคติน ด้วยความเร็ว 12000 g ที่  $4^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 10 นาที ทำการหาความเข้มข้นของเอนไซม์ทั้งหมด ( $E_t$ ) และเอนไซม์ที่เหลืออยู่ ( $E_f$ ) ในส่วนใสด้วยวิธี Bradford's แล้วคำนวณหาความเข้มข้นของเอนไซม์ที่จับกับโคติน ( $E_b$ ) จากสมการ  $E_t = E_f + E_b$  ส่วนการหาค่า equilibrium adsorption isotherm ทำโดยบ่มเอนไซม์โคตินเนสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ตั้งแต่ 0 ถึง  $7.0\ \mu\text{M}$  ที่อุณหภูมิ  $0^{\circ}\text{C}$  กับ 1.0 mg ของโคตินชนิดต่าง ๆ เป็นเวลา 60 นาที หลังจากนั้นทำการปั่นแยกส่วนใสที่มีเอนไซม์อิสระออกจากเอนไซม์ที่จับกับโคตินด้วยความเร็ว 12,000 xg แล้วนำมาวัดค่าโปรตีนด้วยวิธี Bradford แล้วสร้างกราฟระหว่าง  $[E_b]$  vs  $[E_f]$  เพื่อหาค่า dissociation binding constants ( $K_d$ ) ของเอนไซม์ wild-type เทียบกับเอนไซม์กลายพันธุ์โดยฟังก์ชัน non-linear regression ใน GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA) (Pantoom et al., 2008)

## 2.6. การศึกษาทางจลนพลศาสตร์

ทำการศึกษาค่าทางจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์โคตินเนส โดยวิธี colorimetric assay โดยในปฏิกิริยา 100  $\mu\text{l}$  ประกอบด้วย 0–500  $\mu\text{M}$  pNP-GlcNAc<sub>2</sub> ในสารละลาย 100 mM sodium acetate buffer, pH 5.0 และ dH<sub>2</sub>O โดยทำการ pre-incubate ของเหลวใน microtiterplate ที่  $37^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นเติมเอนไซม์ปริมาณ 400 ng และบ่มปฏิกิริยาต่อไปอีก 10 นาที ที่อุณหภูมิ  $37^{\circ}\text{C}$  แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม 50  $\mu\text{l}$  1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ทำการวัดหาปริมาณ pNP ที่เกิดขึ้นโดยวัดการดูดกลืนแสงที่  $A_{405}$  และสร้างกราฟมาตรฐานของ pNP ในช่วง 0–30 nmol ต่อจากนั้นทำการคำนวณค่าคงที่ทางจลนพลศาสตร์ เช่นค่า  $K_m$  ค่า  $V_{max}$  ค่า  $k_{cat}$  จากการทดลองซ้ำสามครั้ง โดยใช้ฟังก์ชัน nonlinear regression จากโปรแกรม GraphPad Prism ส่วนการหาค่าทางจลนพลศาสตร์ด้วยน้ำตาล chitohexaose และ colloidal chitin ใช้วิธี DMAB assay โดยทำปฏิกิริยา 200  $\mu\text{l}$  ที่มี 0–500  $\mu\text{M}$  NAG<sub>6</sub> กับ 50  $\mu\text{g}$  เอนไซม์ ใน 100 mM sodium acetate buffer, pH 5.5 ที่  $37^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยการต้มที่  $100^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 3 นาที แล้วนำปริมาตรทั้งหมดในปฏิกิริยามาวัดหาน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DMAB assay ส่วน colloidal chitin ใช้วิธีเดียวกันกับน้ำตาล chitohexaose แต่ใช้ความเข้มข้น 0 to 5.0 % (w/v) ทำการวัดผลผลิตน้ำตาลที่เกิดขึ้นจากกราฟมาตรฐานของน้ำตาล GlcNAc<sub>2</sub> ที่ช่วง 0–1.75  $\mu\text{mol}$  และหาค่าทางจลนพลศาสตร์ต่าง ๆ จาก ฟังก์ชัน nonlinear regression (Pantoom et al., 2008)

## 2.7. การทำ homology modeling

นำลำดับของกรดอะมิโนของเอนไซม์โคตินเนส เอ จากเชื้อ *V. carchariae* (UniProtKB/TrEMBL accession number Q9AMP1) submit เข้าไปใน Swiss-Model (<http://swissmodel.expasy.org/>) เพื่อทำนายโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์โดยใช้โครงสร้างเชิงซ้อนของเอนไซม์โคตินเนส เอ กลายพันธุ์ E315L จากเชื้อ *S. marcescens* กับ hexaNAG (PDB code: 1NH6) เป็นโครงสร้างต้นแบบ และแสดงโครงสร้างที่

ทำนายได้ด้วยโปรแกรม Pymol ([www.pymol.org](http://www.pymol.org)) ทำการหาตำแหน่งของกรดอะมิโนที่บริเวณเร่งโดย superimpose กรดอะมิโน 459 ตัวของโครงสร้างที่ทำนายได้ของเอนไซม์โคติเนส เอ จากเชื้อ *Vibrio* กับ กรดอะมิโนที่ตำแหน่งเดียวกันกับเอนไซม์ของ *Serratia* แล้ว dock น้ำตาล hexaNA6 เข้ากับบริเวณเร่งของ เอนไซม์จาก *Vibrio* ด้วยโปรแกรม Superpose ใน CCP4 suit package (Collaborative Computational Project, 1994)

## 2.8. การปลูกผลึกเอนไซม์โคติเนส เอ

ทำการหาสภาวะที่เหมาะสมในการปลูกผลึกเอนไซม์โคติเนส เอ ด้วย sitting drop CrystalQuick™ plates (Greiner bio-one, Frickenhausen, Germany) โดยเครื่อง Screenmaker 96+8™ Robot (Innovadyne Technologies, Inc., Santa Rosa, CA, USA) หรือ 96-well microbatch IMP@CT plates (Greiner bio-one, Germany) โดยเครื่อง Oryx8 protein crystallization robot (Douglas Instruments Ltd, UK) แต่ละ crystallisation drop ประกอบด้วย 20 nL ของเอนไซม์ที่เตรียมใหม่ความเข้มข้น 20 mg/ml ในสารละลายบัฟเฟอร์ 10 mM Tris-HCl, pH 8.0 ที่มี 20 nL ของสารช่วยตกผลึก Crystal Screen HT & SaltRx HT จาก Hampton Research, Aliso Viejo, CA, USA หรือ JBScreen HTS I & II จาก Jena Bioscience GmbH, Jena, Germany จากนั้นทำการหาสภาวะที่เหมาะสมในการตกผลึกต่อจาก condition ต่าง ๆ ที่ได้จากสารช่วยตกผลึก JBScreen HTS II โดยการทำการ macro seeding พบว่าสภาวะที่เหมาะสมคือที่อุณหภูมิในการปลูกผลึก 16 °C ที่ความเข้มข้นของโปรตีน 5 mg/ml สารช่วยตกผลึกคือ 1.2 M ammonium sulphate และ 0.1 M Tris-HCl, pH 8.0 ผลึกเอนไซม์ดั้งเดิมที่ได้นำไปหาค่าการหักเหรังสีเอกซ์มีขนาดเท่ากับ  $230 \times 100 \times 15 \mu\text{m}^3$

ส่วนการปลูกผลึกโปรตีนกลายพันธุ์ E315M ใช้วิธี microbatch และ sitting drop สภาวะเริ่มต้นที่ให้ผลบวกคือ 20% (w/v) PEG 4000 และ 200 mM Ammonium sulphate (condition D10 จาก JBScreen HTS I) ที่อุณหภูมิ 16 °C จึงเลือกสภาวะนี้มาทำการ optimize ต่อด้วยวิธี hanging-drop vapour diffusion ในวันที่หกพบผลึกโปรตีนเดี่ยวขนาด  $100 \times 30 \times 50 \mu\text{m}^3$  ใน 20% (w/v) PEG 4000, 0.1 M ammonium sulphate และ 0.1 M Tris-HCl, pH 7.5 ส่วนผลึกโปรตีนที่ soak ด้วยสับสเตรท ได้จากการปลูกผลึกที่ 16% (w/v) PEG 4000, 0.1 M  $\text{MgCl}_2$  ใน 0.1 M HEPES, pH 7.0 การ soak ทำโดยการถ่ายผลึกมายังสาร cryoprotectant ที่ประกอบด้วย mother liquor ที่มี 20% (w/v) PEG 4000, 10% (v/v) glycerol และ 10 mM  $\text{NAG}_5$  or  $\text{NAG}_6$  แล้วทิ้งผลึกค้างคืนที่ 16 °C หลังจากนั้นทำการ mounted ผลึกโดยตรงด้วย liquid nitrogen cryostream เพื่อนำไปศึกษาการหักเหรังสีเอกซ์ (Songsiriritthigul et al., 2008)

## 2.9. การหาโครงสร้างสามมิติ

ทำการเก็บข้อมูลการหักเหรังสีเอกซ์ของผลึกโคติเนสโดยเครื่อง Rikagu/MSF FR-E Super Bright ที่ต่อกับตัวรับชนิด R-Axis IV<sup>++</sup> imaging plate detector (Institute of Cell and Molecular Biology, Singapore) ทำการวิเคราะห์ข้อมูลเบื้องต้นด้วยโปรแกรม MOSFLM (Leslie, 1991) ส่วนการหาโครงสร้างใช้วิธี molecular replacement โดยโปรแกรม AmoRe จาก CCP4 suite package (Navaza, 1994) เอนไซม์กลายพันธุ์ E315M เป็นตัวแรกที่สามารถแก้ปัญหาเรื่องเฟสได้โดยใช้โครงสร้างผลึกของ *S. marcescens* chitinase A (PDB code 1CTN) เป็นโครงสร้างแม่แบบ ส่วนการแก้ปัญหาเฟสของโครงสร้าง wild-type โครงสร้าง E315M+NAG<sub>5</sub> และ E315M+NAG<sub>6</sub> ใช้โครงสร้างของ E315M เป็นแม่แบบ ค่าความละเอียดที่ได้จากโครงสร้างทั้งสี่อยู่ในช่วง 2.0-1.7 อังสตรอม

ทำการ refine โครงสร้างของ E315M ทั้งหมดโดยวิธี rigid body refinement ซึ่งใช้โปรแกรม REFMAC จาก CCP4 suite (Collaborative Computational Project Number 4, 1994; Murshudov et al., 1997) ส่วนการทำ refinement ของโครงสร้าง wild-type เริ่มต้นด้วย non-crystallographic symmetry (NCS) restraint refinement เพื่อกำหนด tightrestraints บน mainchain และ sidechain ในระหว่างการทำ refinement ได้สร้าง model ด้วยโปรแกรม O (Jones et al., 1991) ส่วนโครงสร้างเชิงซ้อนได้นำ sugar coordinates จาก protein databank (PDB code 1NH6) เข้าไป model ในแผนที่โอเลคตรอนที่ได้คือ  $2F_o - F_c$  และ  $F_o - F_c$  แล้ว refine ต่อ จนกระทั่งได้ค่า R free factor ที่ converge โดยโครงสร้างสุดท้ายของ wild-type E315M E315M+NAG<sub>5</sub> และ E315M+NAG<sub>6</sub> หลังการทำ refinement ให้ค่า R-factor เป็น 16.8, 18.9, 18.7 และ 18.1 18% และค่า  $R_{free}$  เป็น 20.5, 21.9, 21.5 และ 21.0 % (ดูตารางที่ 12 ประกอบ) ตามลำดับ ทำการตรวจสอบ geometry ของโครงสร้างสุดท้ายด้วยโปรแกรม PROCHECK (Laskowski et al., 1993) ทำการเปรียบเทียบโครงสร้างทั้งสี่ของเอนไซม์โคติเนส ที่ได้ด้วยโปรแกรม Superpose และหา direct contact ด้วยโปรแกรม Contact ที่มีอยู่ใน CCP4 suite ทำการแสดงโครงสร้างผลึกทั้งหมดโดยโปรแกรม Pymol (www.pymol.org) (Songsirithigul et al., 2008)

## 3. ผลการวิจัยและอภิปราย

### 3.1. การศึกษาผลของการกลายพันธุ์ของกรดอะมิโนที่บริเวณเร่ง

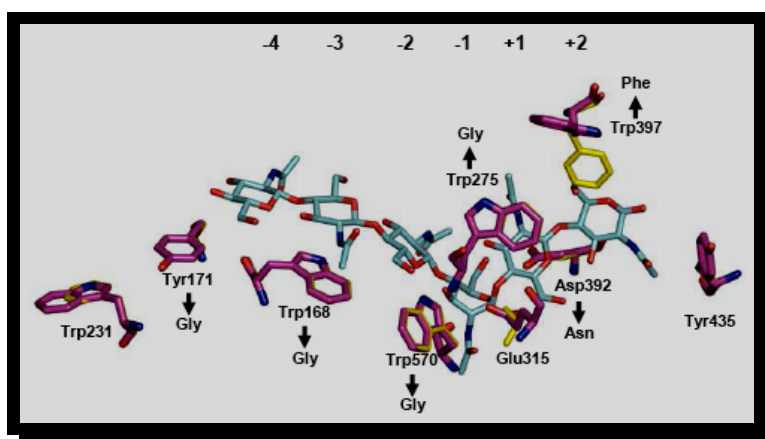
งานวิจัยเริ่มต้นที่ทำการออกแบบสังเคราะห์ mutagenic primer เพื่อทำการเปลี่ยนกรดอะมิโนวงแหวนที่บริเวณเร่งของเอนไซม์โคติเนส เอ ทั้งหมด Trp168 Tyr171 Trp275 Trp397 และ Trp570 จากการเปรียบเทียบลำดับของกรดอะมิโนของเอนไซม์นี้กับโคติเนสจากแบคทีเรียอื่น ๆ และจากแบบจำลองโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์โคติเนสที่ใช้โครงสร้างสามมิติของโคติเนส เอ จากเชื้อ *Serratia marcescens* เป็นต้นแบบพบว่ากรดอะมิโนทั้งหมดนี้มีลักษณะ conserved และมีการจัดเรียงตัวอยู่ที่ส่วนบนของ TIM barrel domain ดังแสดงในรูปที่ 1





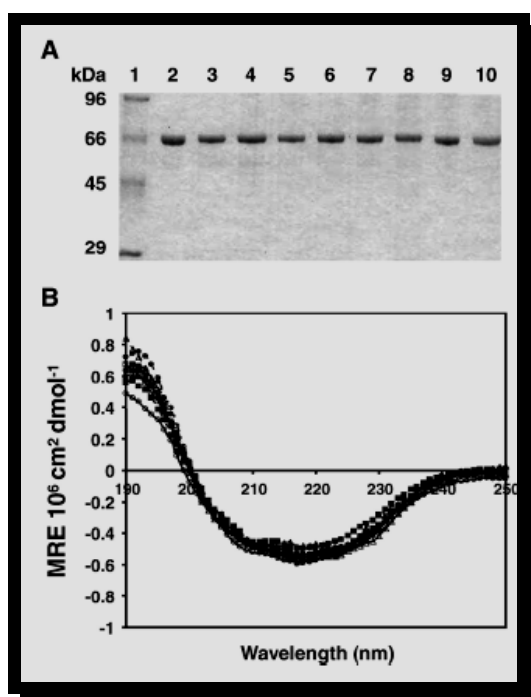
รูปที่ 1 แสดงแบบจำลองโครงสร้างสามมิติของไคติเนส เอ จากแบคทีเรีย *Vibrio carchariae* ที่แสดงตำแหน่งของกรดอะมิโนวงแหวน Trp168 Tyr171 Trp275 Trp397 และ Trp570 ที่บริเวณด้านบนของ TIM barrel domain (แหล่งที่มา Suginta et al., BBA-General Subjects, 2007)

การทดลองเปลี่ยน Trp168 Tyr171 Trp275 Trp397 และ Trp570 โดยเทคนิค site-directed mutagenesis ทำให้ได้ single mutant 5 ตัวคือ W168G Y171G W275G W397F และ W570G มี double mutant 1 ตัว คือ W397F/W570G) มี triple mutant 1 ตัวคือ W397F/W570G/ W275G และมี quadruple mutant 1 ตัวคือ W397F/W570G/W275G/Y171G กรดอะมิโนเหล่านี้จัดเรียงอยู่ในบริเวณจับกับสับสเตรท 6 บริเวณคือ  $(-4)(-3)(-2)(-1)(+1)(+2)$  ดังแสดงในรูปที่ 2



รูปที่ 2 การจัดเรียงตัวของกรดอะมิโนวงแหวนที่บริเวณเร่งของไคติเนส เอ ที่เป็นเป้าหมายของการกลายพันธุ์ (แหล่งที่มา Suginta et al., BBA-General Subjects, 2007)

หลังจากการตรวจสอบความถูกต้องของการเปลี่ยนชนิดของนิวคลีโอไทด์ด้วยการทำ DNA sequencing ได้ศึกษาการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนในเซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* สายพันธุ์ M15 พบว่าเซลล์สามารถผลิตโปรตีนออกปริมาณมาก เมื่อเหนี่ยวนำด้วย IPTG ความเข้มข้น 0.5 mM อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จึงทำบริสุทธิ์ด้วย Ni-NTA affinity chromatography และชะโปรตีนออกด้วย 250 mM imidazole พบว่าได้โปรตีนไคติเนส เอ มีความบริสุทธิ์สูง (รูปที่ 3A) และปริมาณของโปรตีนที่ผลิตได้คือ 10-15 mg โปรตีนบริสุทธิ์ต่อเซลล์ 1 ลิตร การวิเคราะห์โครงสร้างระดับทุติยภูมิด้วย CD spectroscopy พบว่าลักษณะของ CD spectra ของโปรตีนกลายพันธุ์มีความคล้ายคลึงกับของโปรตีน wild-type (รูปที่ 3B) แสดงว่ากรดอะมิโนที่ได้ทำการเปลี่ยนแปลงไม่ส่งผลกระทบต่อโครงสร้างโดยรวมของโปรตีน



รูปที่ 3 (A) SDS-PAGE ของโปรตีนกลายพันธุ์ที่ทำบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค Ni-NTA agarose affinity chromatography (B) CD spectra ของโปรตีนกลายพันธุ์ที่บริสุทธิ์ (แหล่งที่มา Suginta et al., BBA-General Subjects, 2007)

การตรวจหาค่า specific hydrolyzing activity ของเอนไซม์กลายพันธุ์เทียบกับเอนไซม์ wild-type โดยดูการสลายของ pNP-[GlcNAc]<sub>2</sub> และ colloidal chitin พบว่าโปรตีนกลายพันธุ์ทั้งหมดยกเว้น W397F ให้ค่า specific activity ต่ำกว่าค่าของโปรตีน wild-type ส่วน W397F ให้ค่า specific activity ของการสลาย pNP-[GlcNAc]<sub>2</sub> สูงเป็น 142 เท่าและให้ค่าที่ไม่แตกต่างกันในสลาย colloidal chitin ของค่าที่ได้จาก wild-type (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ค่า specific hydrolyzing activity ของโปรตีน wild-type และโปรตีนกลายพันธุ์ (แหล่งที่มา Suginta et al., BBA-General Subjects, 2007)

Chitinase A variant	Specific hydrolyzing activity	
	( $\times 10^{-3}$ $\mu\text{mol pNP/min}/\mu\text{g}$ ) <sup>a</sup>	( $\mu\text{mol reducing sugars/min}/\mu\text{g}$ ) <sup>b</sup>
Wild-type	1.84 $\pm$ 0.05 (100) <sup>c</sup>	1.99 $\pm$ 0.018 (100)
D392N	0.61 $\pm$ 0.09 (33.4)	n.d. <sup>d</sup>
W168G	0.24 $\pm$ 0.03 (13.0)	n.d.
Y171G	0.36 $\pm$ 0.00 (19.5)	n.d.
W275G	0.20 $\pm$ 0.00 (11.1)	0.10 $\pm$ 0.001 (5.0)
W397F	2.61 $\pm$ 0.08 (141.8)	2.04 $\pm$ 0.061 (102.5)
W570G	0.11 $\pm$ 0.00 (5.6)	n.d.
Double mutant (W570G/W397F)	0.10 $\pm$ 0.002 (5.5)	n.d.
Triple mutant (W570G/W397F/W275G)	0.01 $\pm$ 0.001 (0.6)	n.d.
Quadruple mutant (W570G/W397F/W275G/Y171G)	0.01 $\pm$ 0.001 (0.6)	n.d.

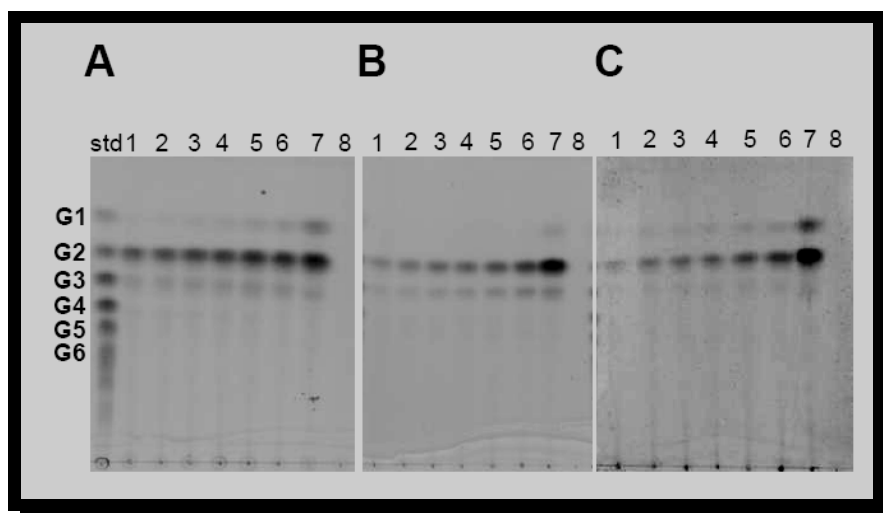
<sup>a</sup> Chitinase activity was measured using pNP-[GlcNAc]<sub>2</sub>, and release of pNP was detected by the colorimetric method.

<sup>b</sup> Chitinase activity was measured using colloidal chitin, and release of reducing sugars was detected by the DMAB method.

<sup>c</sup> Values in brackets represent relative activity compared to that of wild-type (set as 100).

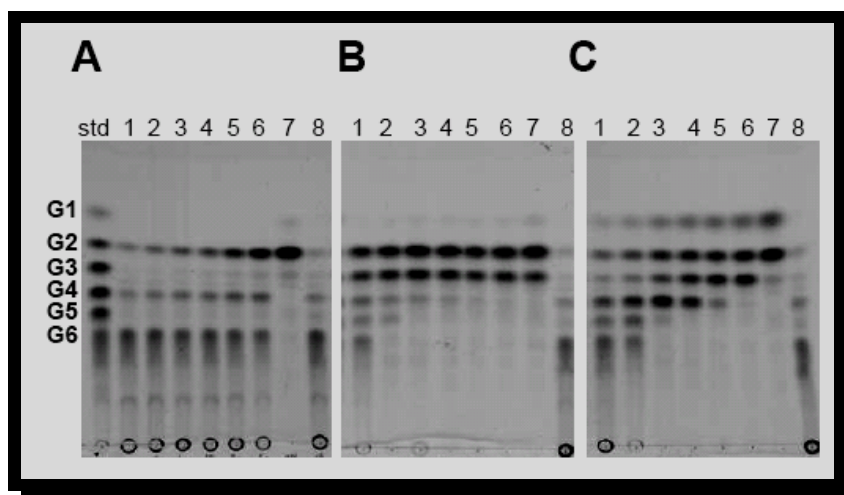
<sup>d</sup> n.d. represents no detectable activity.

ผลการทดลองที่ได้จากตารางที่ 2 ให้ข้อสรุปว่าการเปลี่ยนกรดอะมิโนวงแหวน W397 มีผลต่อการสลายของสับสเตรทโมเลกุลเล็ก ๆ และไคตินโพลิเมอร์ จากการวิเคราะห์ชนิดของผลิตภัณฑ์น้ำตาลที่ได้จากการสลาย colloidal chitin และไคโตโอลิโกแซคคาร์ไรด์ขนาด 2-6 หน่วย (NAG<sub>2</sub>-NAG<sub>6</sub>) พบว่าโปรตีนกลายพันธุ์ W168G, Y171G, W570G ไม่สามารถสลายไคตินได้ที่เวลา 18 ชั่วโมง ส่วนโปรตีน W275G และ W397F สามารถสลาย colloidal chitin ได้ที่เวลาของการบ่มตั้งแต่ 2.5 นาที ถึง 18 ชั่วโมง ได้น้อยลงแต่ไม่เปลี่ยนแปลงรูปแบบการสลายไคตินมากนักเมื่อเทียบกับ wild-type โดยผลิตภัณฑ์หลักที่ได้คือ NAG<sub>2</sub> และผลิตภัณฑ์รองคือ NAG<sub>1</sub> ดังแสดงในรูปที่ 4



รูปที่ 4 การวิเคราะห์ทาง TLC แสดงการสลาย colloidal chitin ด้วย A) wild-type B) W275G และ C) W397F ช่อง std คือ G1-G6 standard mix; 1-7 คือเวลาในการบ่ม 2, 5, 10, 15, 30, 60 นาที และ 18 ชั่วโมง และ 8 คือ substrate blank (แหล่งที่มา Suginta et al., BBA-General Subjects, 2007)

ส่วนผล TLC แสดงถึงโปรตีนทุกตัวไม่สามารถสลาย  $\text{NAG}_2$  ได้เลยและ W275G เป็นโปรตีนตัวเดียวที่สลาย  $\text{NAG}_3$  ได้เป็น  $\text{NAG}_2 + \text{NAG}_1$  และโปรตีนที่สลายน้ำตาล  $\text{NAG}_4 - \text{NAG}_6$  ได้ดีกว่า wild-type คือ W275G และ W397F การศึกษาผลของเวลาในการบ่มต่อการสลายน้ำตาล G6 ของโปรตีนกลายพันธุ์ทั้งสองตัวนี้เทียบกับ wild-type พบว่า W275G สลาย  $\text{NAG}_6$  ได้เป็นน้ำตาล  $\text{NAG}_2 + \text{NAG}_3$  เป็นหลัก ส่วนโปรตีน W397F สลายน้ำตาล  $\text{NAG}_6$  ให้เป็นตัวกลางขนาดต่าง ๆ ตั้งแต่  $\text{NAG}_1 - \text{NAG}_5$  และที่เวลาของการบ่มเป็น 18 ชั่วโมงจะได้ผลิตภัณฑ์เป็น  $\text{NAG}_2 + \text{NAG}_1$  ซึ่งลักษณะการย่อยน้ำตาล  $\text{NAG}_6$  ของโปรตีนกลายพันธุ์ทั้งสองต่างไปจากโปรตีน wild-type อย่างสิ้นเชิง (รูปที่ 5) โดยที่ผลิตภัณฑ์หลักของการสลาย  $\text{NAG}_6$  ของ wild-type คือน้ำตาล  $\text{NAG}_2 + \text{NAG}_4$

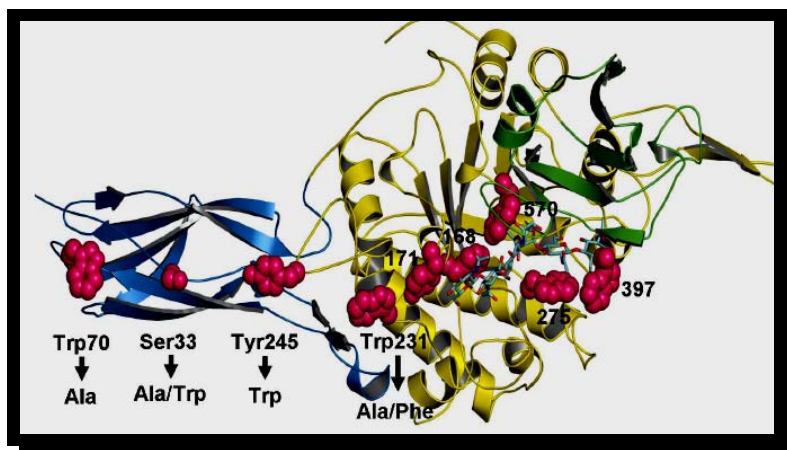


รูปที่ 5 การวิเคราะห์ทาง TLC ที่แสดงรูปแบบการสลาย hexaNAG ด้วย A) wild-type B) W275G และ C) W397F ช่องที่ std คือ G1-G6 standard mix; 1-7 เวลาที่ใช้ในการบ่มตั้งแต่ 2, 5, 10, 15, 30, 60 นาที และ 18 ชั่วโมง; 8 คือ substrate blank (แหล่งที่มา Suginta et al., BBA-General Subjects, 2007)

จากรูปที่ 2 พบว่ากรดอะมิโน W275 จัดเรียงตัวอยู่ในตำแหน่ง จับที่ -1 ส่วนกรดอะมิโน W397 จะอยู่ในบริเวณจับสุดท้ายคือ +2 กรดอะมิโนทั้งสองน่าจะเป็นตัวกำหนดการจับของน้ำตาล  $\text{NAG}_6$  ให้เข้ามาอยู่ในตำแหน่งที่เหมาะสมที่จะทำให้เกิดการย่อยที่พันธะที่สองจากด้านรีดิวซ์เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็น  $\text{NAG}_2 + \text{NAG}_4$  การเปลี่ยนแปลงชนิดของกรดอะมิโนทำให้กรดอะมิโน Trp275 และ Trp397 สูญเสียความสามารถในการเลือกจับแบบจำเพาะทำให้ผลิตภัณฑ์ที่แตกต่างไปจากเดิมมาก

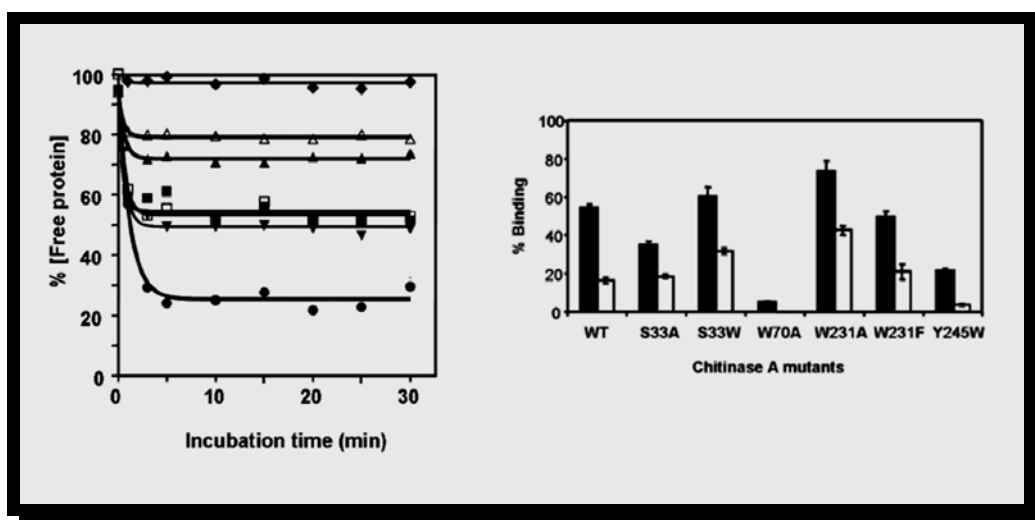
### 3.2. การศึกษาผลของการกลายพันธุ์ที่บริเวณจับกับไคติน

งานวิจัยต่อมาคือทำการออกแบบสังเคราะห์ mutagenic primer เพื่อทำการเปลี่ยนกรดอะมิโนที่ conserved ที่บริเวณจับกับไคติน (chitin binding domain, ChBD) ของเอนไซม์ไคติเนส เอ สองตัวคือ Ser33 และ Trp70 บริเวณด้านนอกบริเวณเร่งที่ติดกับ ChBD อีกสองตัวคือ Trp231 และ Tyr245 จากการเปรียบเทียบลำดับของกรดอะมิโนของเอนไซม์นี้กับไคติเนสจากแบคทีเรียอื่น ๆ และจากแบบจำลองโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ไคติเนสที่ใช้โครงสร้างสามมิติของไคติเนส เอ จากเชื้อ *Serratia marcescens* เป็นต้นแบบพบว่ากรดอะมิโนทั้งหมดนี้มีลักษณะ conserved และมีการจัดเรียงตัวอยู่ที่ผิว (surface exposed) ของเอนไซม์ โดยที่กรดอะมิโน Trp70 จะอยู่นอกสุดและ Trp231 จะอยู่ด้านในสุดติดกับปลายด้านรีดิวซ์ (รูปที่ 6)



รูปที่ 6 แสดงแบบจำลองโครงสร้างสามมิติของไคติเนส เอ จากแบคทีเรีย *Vibrio carchariae* ที่แสดงตำแหน่งของกรดอะมิโน Ser33 Trp70 Trp231 และ Tyr245 ที่บริเวณด้านนอกโมเลกุลของไคติเนส (แหล่งที่มา Pantoom et al., BMC-Biochem, 2008)

การทดลองศึกษาผลของการกลายพันธุ์ต่อการจับกับสับสเตรทโดยการทำ chitin binding assay พบว่าเอนไซม์กลายพันธุ์ W70A จะจับกับ colloidal chitin ได้น้อยที่สุด ส่วนเอนไซม์ W231A จับไคตินได้มากที่สุดโดยเอนไซม์ที่ศึกษาทั้งหมดมีลำดับของการจับไคตินเมื่อเทียบกับไคติเนสดั้งเดิมดังนี้คือ W231A> S33W >WT  $\cong$  W231F>S33A>Y245W>W70A โดยผลของการจับแสดงไว้ในรูปที่ 7A และ 7B



รูปที่ 7 การจับของโปรตีนกลายพันธุ์ที่ผิวโปรตีนกับไคติน A) ผลของเวลาต่อการจับ B) การจับของโปรตีนกลายพันธุ์กับไคตินสองชนิดคือ colloidal chitin (closed bar) และ crystalline chitin (open bar) สัญลักษณ์คือ wild-type (■); S33A (▲); S33W (▼); W70A (◆); W231A (●); W231F (□); และ Y245W (△) (แหล่งที่มา Pantoom et al., BMC-Biochem, 2008)

เมื่อศึกษาผลของการกลายพันธุ์ต่อค่า hydrolytic activity ของเอนไซม์ต่อสับสเตรทสามชนิดคือ pNP-[GlcNAc]<sub>2</sub> crystalline chitin และ colloidal chitin ดังแสดงในตารางที่ 2 พบว่าการกลายพันธุ์มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่า hydrolytic activity ของ pNP สับสเตรทเพียงเล็กน้อย แต่พบว่าโปรตีนกลายพันธุ์ S33A W70A W231A และ W231F ให้ค่าแอคติวิตี้ต่อสับสเตรทสายยาวคือ colloidal chitin และ crystalline chitin ลดลงอย่างมาก เมื่อเทียบกับโปรตีนดั้งเดิม ส่วนโปรตีนกลายพันธุ์ S33W และ Y245W จะให้ค่าแอคติวิตี้สูงขึ้น

ตารางที่ 2 ผลของการกลายพันธุ์ต่อค่า hydrolytic activity ของเอนไซม์ไคติเนส เอ (แหล่งที่มา Pantoom et al., BMC-Biochem, 2008)

Protein	Specific hydrolyzing activity (U/ $\mu$ mol protein) <sup>a</sup>		
	Crystalline chitin	Colloidal chitin	pNP-[GlcNAc] <sub>2</sub>
Wild-type	0.59 $\pm$ 0.02 (100) <sup>b</sup>	12.9 $\pm$ 0.22 (100)	50.5 $\pm$ 1.13 (100)
S33A	n.d. <sup>c</sup>	8.5 $\pm$ 0.50 (66)	58.0 $\pm$ 1.08 (115)
S33W	1.00 $\pm$ 0.08 (166)	15.3 $\pm$ 0.32 (119)	54.0 $\pm$ 2.55 (107)
W70A	n.d.	4.3 $\pm$ 0.17 (33)	52.8 $\pm$ 2.14 (105)
W231A	n.d.	6.6 $\pm$ 0.26 (51)	45.2 $\pm$ 2.00 (90)
W231F	n.d.	9.2 $\pm$ 0.49 (71)	54.3 $\pm$ 2.85 (108)
Y245W	1.49 $\pm$ 0.09 (250)	19.6 $\pm$ 0.53 (152)	53.6 $\pm$ 1.61 (106)

<sup>a</sup> One unit of chitinase is defined as the amount of enzyme that releases 1  $\mu$ mol of [GlcNAc]<sub>2</sub> or 1 nmol of pNP per min at 37°C.  
<sup>b</sup> Values in parentheses represent relative specific hydrolyzing activities (%).  
<sup>c</sup> Non-detectable activity.

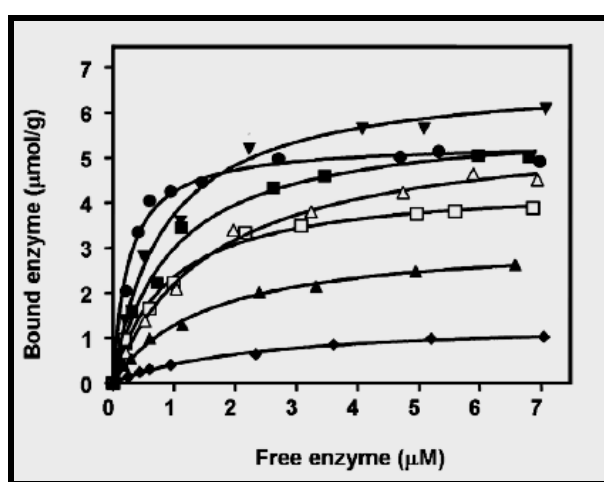
การศึกษาค่าทางจลนพลศาสตร์กับ chitohexamer กับ colloidal chitin พบว่าโปรตีนกลายพันธุ์ทุกตัวให้ ค่า  $K_m$  ต่อสับสเตรทไคโตโอลิโกแซคคารไรด์ลดลงเล็กน้อย และไม่มีผลอย่างมีนัยสำคัญกับค่า  $k_{cat}$  และค่า  $k_{cat}/K_m$  ของเอนไซม์ ในทางตรงข้ามกับโปรตีนกลายพันธุ์ S33A W70A W231A และ W231F ให้ค่า  $k_{cat}$  และค่า  $k_{cat}/K_m$  ต่อสับสเตรทสายยาว (colloidal chitin) น้อยลงมาก โปรตีนกลายพันธุ์ที่ให้ค่า  $k_{cat}/K_m$  น้อยที่สุดคือ W70A ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ผลของการกลายพันธุ์ต่อค่าจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ไคติเนส เอ (แหล่งที่มา Pantoom et al., BMC-Biochem, 2008)

Chitinase A variant	Chitohexase			Colloidal chitin		
	$K_m (\mu\text{M})$	$k_{\text{cat}} (\text{s}^{-1})$	$k_{\text{cat}}/K_m (\text{s}^{-1}\text{M}^{-1})$	$K_m (10^1 \text{ mg ml}^{-1})$	$k_{\text{cat}} (\text{s}^{-1})$	$k_{\text{cat}}/K_m (10^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ mg ml}^{-1})$
Wild-type	$218 \pm 22.0$	2.9	$1.3 \times 10^3 (100)^a$	$1.74 \pm 0.1$	1.2	0.7 (100)
S33A	$171 \pm 20.5$	2.6	$1.5 \times 10^3 (115)$	$2.07 \pm 0.2$	0.9	0.4 (57)
S33W	$210 \pm 15.4$	2.8	$1.3 \times 10^3 (100)$	$1.58 \pm 0.2$	1.4	0.9 (129)
W70A	$185 \pm 22.0$	2.5	$1.3 \times 10^3 (100)$	$2.26 \pm 0.4$	0.4	0.2 (29)
W231A	$189 \pm 13.2$	2.6	$1.4 \times 10^3 (108)$	$1.01 \pm 0.2$	0.6	0.6 (86)
W231F	$163 \pm 10.3$	2.4	$1.5 \times 10^3 (115)$	$1.70 \pm 0.2$	0.9	0.5 (71)
Y245W	$201 \pm 13.1$	2.6	$1.3 \times 10^3 (100)$	$1.82 \pm 0.2$	1.7	0.9 (129)

<sup>a</sup> Relative catalytic efficiencies (%) are shown in parentheses.

การศึกษาค่า adsorption isotherms พบว่า S33W และ W231A ให้ค่าการจับกับ colloidal chitin สูงกว่าโปรตีน wildtype ส่วน ไคติเนสกลายพันธุ์ W70A, S33A, W231F และ Y245W ให้ค่าการจับกับไคตินน้อยกว่า เมื่อคำนวณหาค่า dissociation binding constants ( $K_d$ ) จากรูปที่ 8 ให้ค่า  $K_d$  ของ wild-type เป็น  $0.95 \pm 0.11 \mu\text{M}$  ซึ่งสูงกว่าค่า  $K_d$  ของ S33W ( $0.84 \pm 0.09 \mu\text{M}$ ) และของ W231F ( $0.88 \pm 0.09 \mu\text{M}$ ) เล็กน้อย แต่สูงกว่าค่าของ W231A ( $0.26 \pm 0.03 \mu\text{M}$ ) อย่างมีนัยสำคัญ ในทางตรงข้ามค่า  $K_d$  ของ S33A ( $1.50 \pm 0.11 \mu\text{M}$ ) ของ W70A ( $2.30 \pm 0.25 \mu\text{M}$ ) และของ Y245W ( $1.60 \pm 0.16 \mu\text{M}$ ) มีค่ามากกว่าค่าของ wild-type จากค่า  $K_d$  ที่ได้สามารถสรุปความสามารถในการจับกับสับสเตรทได้เป็นลำดับดังนี้คือ W231A>S33W>W231F>wild-type>S33A>Y245W>W70A ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับผลของ chitin binding assay และค่าทางจลนพลศาสตร์ดังแสดงในรูปที่ 7 และตารางที่ 3 ตามลำดับ

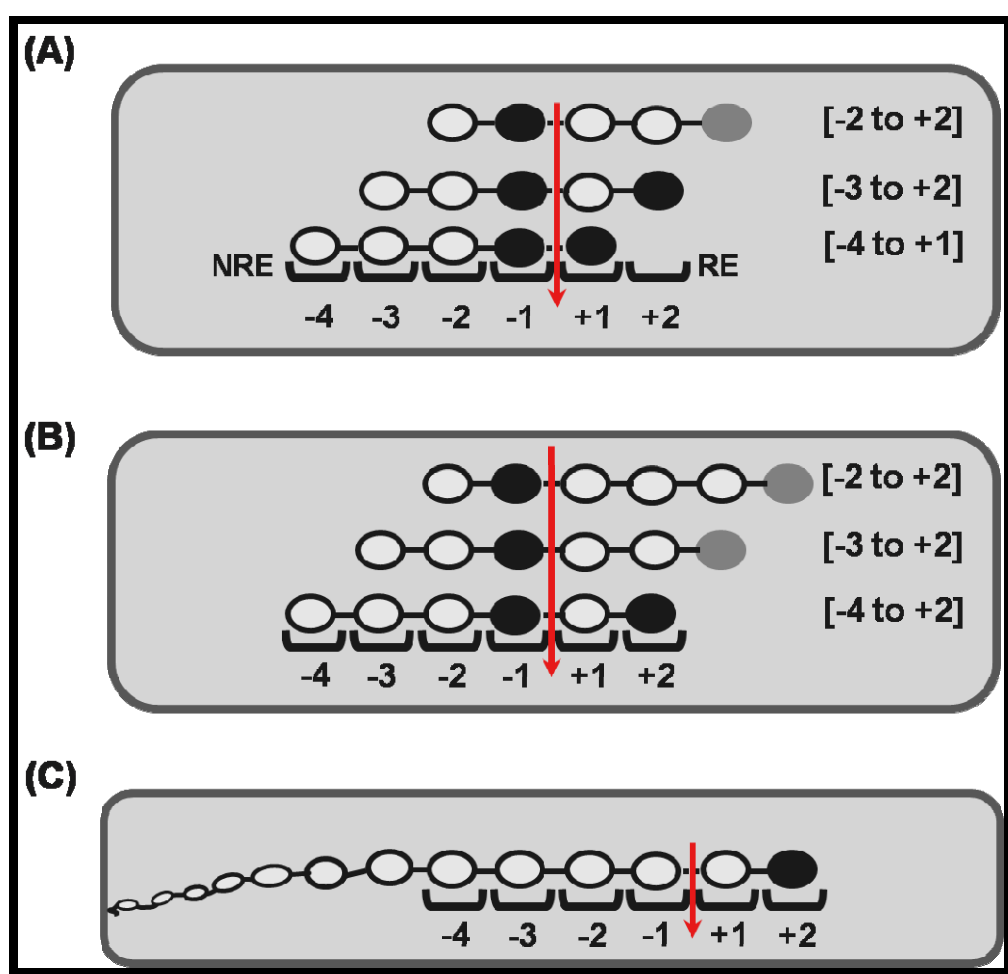


รูปที่ 8 Adsorption binding isotherm ของโปรตีนกลายพันธุ์ที่ผิวโปรตีนกับ colloidal chitin (closed bar) สัญลักษณ์คือ wild-type (■); S33A (▲); S33W (▼); W70A (◆); W231A (●); W231F (□); และ Y245W (△) (แหล่งที่มา Pantoom et al., BMC-Biochem, 2008)



### 3.3. การศึกษากลไกการเลือกจับของสับสเตรทบนบริเวณเร่งและการเลือกใช้อะโนเมอร์ของ เอนไซม์ไคติเนส

งานวิจัยขั้นต่อมาได้ทำการศึกษาความเลือกจับของสับสเตรทชนิดต่าง ๆ บนบริเวณ substrate binding subsites ของเอนไซม์ โดยใช้เทคนิค quantitative HPLC MS จากข้อเสนองานของ Watanabe และ ผู้ร่วมวิจัย (Imai et al., 2002) ที่ว่าน้ำตาลไคโตโอลิโกแซคคาไรด์สายสั้นจะเข้าจับกับบริเวณจับแบบสุ่ม ส่วนน้ำตาลไคตินสายยาวเข้าสู่บริเวณเร่งโดยการ feed เข้าจากทางด้านโดเมนจับไคติน (ChBD) ด้านเดียว เท่านั้น ในการทดลองนี้จึงได้เสนอกลไกการเข้าจับของน้ำตาล pentaNAG และ hexaNAG ซึ่งเป็นตัวแทน ของน้ำตาลสายสั้น และไคตินสายยาว ดังแสดงในรูปที่ 9



รูปที่ 9 กลไกการจับของน้ำตาลไคโตโอลิโกแซคคาไรด์และไคตินที่บริเวณเร่งของเอนไซม์ไคติเนส (A) pentaNAG hydrolysis; (B) hexaNAG hydrolysis; และ (C) chitin hydrolysis (แหล่งที่มา Suginta et al., J Chem Biol, 2009)

จากรูปจะเห็นว่าน้ำตาล pentaNAG จะสามารถจับบนบริเวณจับได้สามแบบคือ 1) จับที่ subsites -4 ถึง +1; 2) จับที่ subsites -3 ถึง +2; และ 3) จับที่ subsites -2 ถึง +2 (รูปที่ 9A) ขณะที่น้ำตาล hexaNAG ก็สามารจับที่บริเวณจับได้สามแบบเช่นกันคือ คือ 1) จับที่ subsites -4 ถึง +2; 2) จับที่ subsites -3 ถึง +2; และ 3) จับที่ subsites -2 ถึง +2 (รูปที่ 9B) ส่วนไคตินสายยาวจะจับได้แบบเดียวคือ ปลายด้านรีดิวซ์จะเริ่มที่บริเวณ +2 ส่วนปลายด้านอนรีดิวซ์ขยายมาทางด้านบริเวณ -4 และด้านโดเมน จับไคตินดังรูปที่ 9C

การศึกษาการย่อยที่เวลาเริ่มต้นที่ 0°C แล้วตรวจหาปริมาณของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นโดยเทคนิค quantitative HPLC ESI/MS พบว่าไคตินสตั้งเดิมย่อยสลายสเตรท pentaNAG จะถูกย่อยเป็นผลิตภัณฑ์สองชนิดคือ NAG<sub>2</sub> และ NAG<sub>3</sub> และย่อย hexaNAG ให้เป็น NAG<sub>2</sub>, NAG<sub>3</sub> และ NAG<sub>4</sub> ซึ่งแสดงว่าการตัดพันธะ ไกลโคซิดิกเกิดขึ้นสองตำแหน่งคือ ตำแหน่งที่สองจากปลายสายและตำแหน่งกลางสายน้ำตาล ส่วนการประมาณเปอร์เซ็นต์ของปีต้าอะโนเมอร์ของผลิตภัณฑ์น้ำตาลที่ได้ได้แสดงไว้ในตารางที่ 4

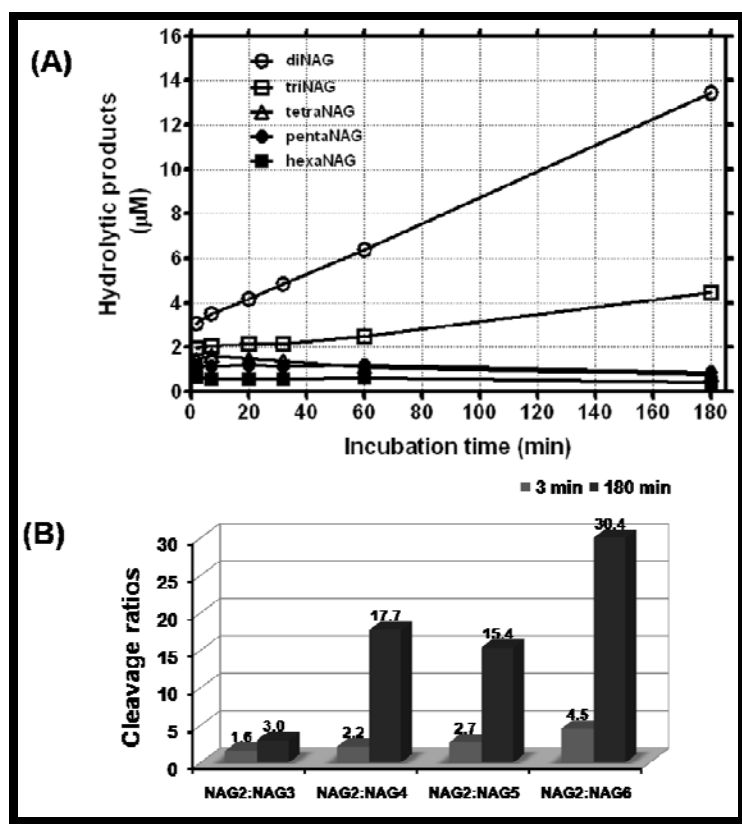
ตารางที่ 4 การประมาณผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการสลายไคโตโอลิโกแซคคาไรด์โดยวิธี quantitative HPLC MS analysis (แหล่งที่มา Suginta et al., J Chem Biol, 2009)

Substrate	Enzyme	The $\beta$ content of initial products				
		NAG1	NAG2	NAG3	NAG4	NAG5
pentaNAG (NAG5)	Wild-type	-	92 (100) <sup>a</sup>	41(42)	-	-
	W275G	-	92	68	-	-
	W397F	85	69	100	100	-
hexaNAG (NAG6)	Wild-type	-	90(100) <sup>b</sup>	67(71)	45(48)	-
	W275G	-	90	64	82	-
	W397F	40	66	100	100	100

<sup>a</sup>The values in brackets are the expected values from the -2 to -2 binding mode for NAG5 hydrolysis.  
<sup>b</sup>The values in brackets are the expected values from a combination of the -3 to +2 and -2 to +2 modes for NAG6 hydrolysis.

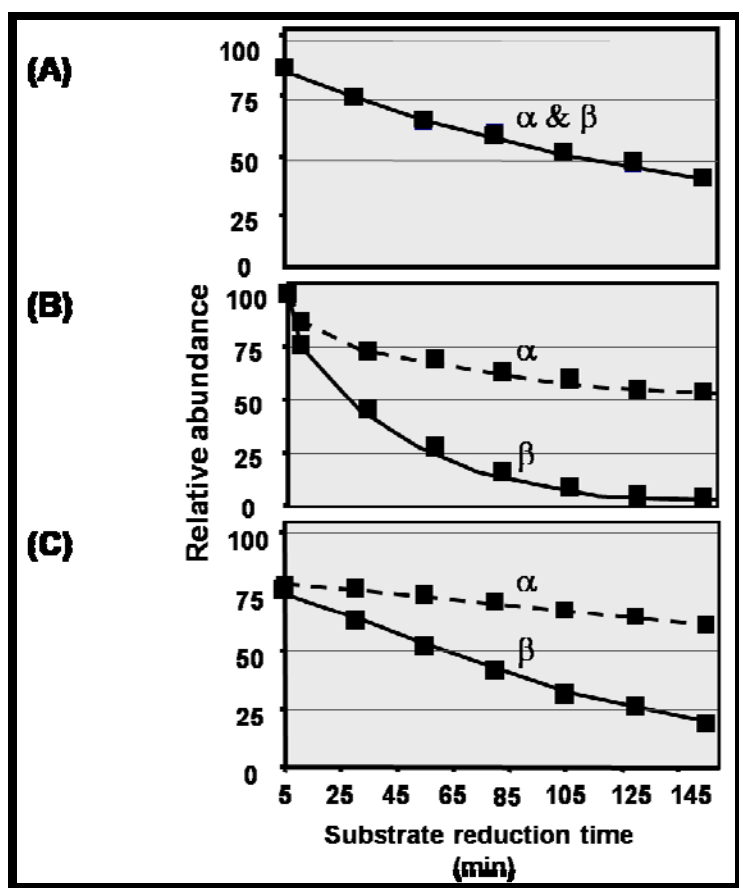
ผลการทดลองในตารางที่ 4 พบว่าเปอร์เซ็นต์การย่อย pentaNAG ด้วย wild-type chitinase ได้เป็น 92%  $\beta$ NAG<sub>2</sub> และ 41%  $\beta$ NAG<sub>3</sub> ซึ่งสอดคล้องกับเปอร์เซ็นต์คำนวณของผลิตภัณฑ์ (100%  $\beta$ NAG<sub>2</sub> และ 42%  $\beta$ NAG<sub>3</sub>) ที่ได้จากการย่อยที่เกิดจากการจับของสับสเตรทโดยใช้ -2 to + 2 binding mode ส่วนเปอร์เซ็นต์การย่อย hexaNAG ได้เป็น 90%  $\beta$ NAG<sub>2</sub>, 67%  $\beta$ NAG<sub>3</sub>, และ 45%  $\beta$ NAG<sub>4</sub> สอดคล้องกับค่าคำนวณของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการจับของสับสเตรทโดยใช้กลไกแบบผสมระหว่าง -3 to +2 binding mode กับ -2 to +2 binding mode คือ 100%  $\beta$ NAG<sub>2</sub>, 71%  $\beta$ NAG<sub>3</sub>, และ 48%  $\beta$ NAG<sub>4</sub> ตามลำดับ (ตารางที่ 4 ค่าในวงเล็บ)

ส่วนผลของการสลายไคตินพบว่าเอนไซม์ไคตินเนสย่อยไคตินเป็นน้ำตาลไคโตโอลิโกแซ็กคาไรด์สายสั้น ๆ มีขนาดตั้งแต่ NAG-NAG<sub>6</sub> ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่ได้ศึกษามาก่อนแล้วแต่ NAG<sub>2</sub> จัดเป็นผลิตภัณฑ์หลักของการย่อย โดยที่เวลาเริ่มต้นของการย่อย (3 นาที) เอนไซม์ผลิต NAG<sub>2</sub> ได้ประมาณ 3  $\mu\text{M}$  และที่สิ้นสุดของปฏิกิริยาจะได้ NAG<sub>2</sub> ปริมาณ 13  $\mu\text{M}$  ส่วนผลิตภัณฑ์รองลงมาคือ NAG<sub>3</sub> ที่ผลิตได้ในช่วงต้นคือ 2  $\mu\text{M}$  และสิ้นสุดที่ 4  $\mu\text{M}$  ส่วนผลิตภัณฑ์อื่นจัดเป็น intermediate ที่สร้างในปริมาณน้อย (น้อยกว่า 2  $\mu\text{M}$ ) ผลการทดลองที่ได้ยืนยันว่าเอนไซม์ไคตินเนสตัดสายไคตินในลักษณะผสมคือสายน้ำตาลสั้น ๆ ตั้งแต่ 3 หน่วยขึ้นไปเกิดจากการจับแบบ random binding และโดยการตัดด้วย endo activity ส่วนน้ำตาล NAG<sub>2</sub> เกือบทั้งหมดถูกสร้างโดยกลไกแบบ feeding โดยการตัดด้วย exo activity (รูปที่ 10A) เมื่อคำนวณค่า cleavage ratio ของน้ำตาล NAG<sub>2</sub> กับน้ำตาลผลิตภัณฑ์อื่น ๆ เทียบกันระหว่างเวลาที่ย่อยเริ่มต้นที่ 3 นาที กับเวลาสิ้นสุดในการทำปฏิกิริยาที่ 3 ชั่วโมงพบว่าสัดส่วนนี้ของ NAG<sub>2</sub> ต่อน้ำตาลชนิดต่าง ๆ มีค่าสูงขึ้นทั้งหมดกล่าวคือ NAG<sub>2</sub>:NAG<sub>3</sub> สูงขึ้น 1.9 เท่า NAG<sub>2</sub>:NAG<sub>4</sub> สูงขึ้น 9 เท่า NAG<sub>2</sub>:NAG<sub>5</sub> สูงขึ้น 5 เท่า และ NAG<sub>2</sub>:NAG<sub>6</sub> สูงขึ้น 6 เท่า (รูปที่ 10B) ซึ่งอัตราส่วนของ NAG ต่อน้ำตาล ๆ อื่น ๆ ที่สูงขึ้นที่เวลาในการทำสลายนานขึ้นแสดงว่าการตัดพันธะน่าจะเกิดขึ้นโดยขบวนการ feeding และแสดงถึงการย่อยสายไคตินแบบ progressive hydrolysis



รูปที่ 10 ปริมาณของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาการย่อย chitin โดยวิธี quantitative HPLC MS (A) Time course of chitin hydrolysis (B) Cleavage ratios (แหล่งที่มา Suginta et al., J Chem Biol, 2009)

การทดลองต่อมาคือการศึกษากลไกของการกลายพันธุ์ต่อการเลือกใช้อะซิโนเมอร์ของสับสเตรท ดังแสดงในรูปที่ 11A พบว่าในช่วงเวลาในการทำปฏิกิริยาตั้งแต่ 0-150 นาที พบว่าอัตราการสลาย  $\beta$ -anomer ของสับสเตรทไม่แตกต่างจากอัตราการสลาย  $\alpha$ -anomer ทั้งนี้แสดงให้เห็นว่าสับสเตรท น่าจะจับกับบริเวณเร่งของเอนไซม์โดยที่ปลายด้านรีดิวซ์ที่ยื่นออกมานอก substrate binding subsites และอยู่ในสภาวะละลายในโครงรูป  $\beta$  - หรือ  $\alpha$  -anomer อยู่ในปริมาณสมดุล (48%  $\beta$  และ 52%  $\alpha$ ) ผลการทดลองสอดคล้องกับการจับของสับสเตรท hexaNAG แบบ -3 to +2 และ +2 to +2 binding modes (รูปที่ 9B) เมื่อทำการเปลี่ยนกรดอะมิโนที่ปลายด้านรีดิวซ์สองตัวคือ Trp275 เป็น Gly และ Trp397 เป็น Phe พบว่าโปรตีนกลายพันธุ์ทั้งสองคือ W275G และ W397F มีความสามารถในการใช้อะซิโนเมอร์ของสับสเตรทเปลี่ยนไปกล่าวคือให้อัตราการสลาย  $\beta$ -anomer ได้ดีกว่า  $\alpha$ -anomer มากเมื่อเทียบกับอัตราการสลายของโปรตีนดั้งเดิม (รูปที่ 11B,C) กรดอะมิโน Trp275 มีความสำคัญกับการจับกับน้ำตาล GlcNAc ที่ตำแหน่งย่อย (cleavage site, -1 to +1) ส่วนกรดอะมิโน Trp397 มีความสำคัญต่อการเลือกจับของเอนไซม์กับน้ำตาลด้านปลายรีดิวซ์คือ +2NAG จากการศึกษาโครงสร้างของเอนไซม์ไคตินเอส เอ กลายพันธุ์กับน้ำตาล pentaNAG และ hexaNAG (Songsiriritthigul et al., 2008) พบว่าการจับกับน้ำตาลที่บริเวณเร่งเกิดขึ้นด้วยพันธะไฮโดรเจนและแรงแไฮโดรโฟบิกเป็นหลัก การเปลี่ยนชนิดของกรดอะมิโน Trp275 เป็นกรดอะมิโน Gly ทำให้มีผลกระทบต่อแรงแไฮโดรโฟบิกที่กระทำต่อน้ำตาลที่ตำแหน่ง -1 และ +1 ส่งผลให้มีการเปลี่ยนการเลือกจับของเอนไซม์โดยมีการเลื่อนตำแหน่งของสายสับสเตรทไปทางด้านออกซิไดซ์ได้เล็กน้อย จากตารางที่ 4 จะเห็นว่าการสลายน้ำตาล hexaNAG จะให้ผลิตภัณฑ์ที่เป็น  $\text{NAG}_2$ ,  $\text{NAG}_3$  และ  $\text{NAG}_4$  เหมือนเดิมแต่เปอร์เซ็นต์ของ  $\beta$  content ที่ได้เปลี่ยนไปจากเดิมแสดงว่าสายน้ำตาลมีการเข้าจับที่บริเวณเร่งเปลี่ยนไป นอกจากนี้โปรตีนกลายพันธุ์ W275G ยังให้ค่าความจำเพาะต่อสับสเตรท (substrate specificity) ทั้งสามตัวคือ pentaNAG hexaNAG และ colloidal chitin ลดลงประมาณ 5 เท่า โดยมีการเปลี่ยนค่าความชอบในการจับ (affinity of binding,  $K_m$ ) ต่อสับสเตรท เล็กน้อย แต่ค่าคงที่ในการสลาย (catalytic rate,  $k_{cat}$ ) ลดลงอย่างมากเมื่อเทียบกับค่าที่ได้จากโปรตีนดั้งเดิม (ตารางที่ 5)



รูปที่ 11 ปริมาณของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาการย่อย chitin โดยวิธี quantitative HPLC MS (A) Time course of chitin hydrolysis (B) Cleavage ratios (แหล่งที่มา Suginta et al., J Chem Biol, 2009)

ส่วนการเปลี่ยนกรดอะมิโน Trp397 เป็น Phe อาจทำให้เกิดผลกระทบต่อแรงไฮโดรโฟบิกที่ทำกับน้ำตาลด้านปลายรีดิวซ์ทำให้ความสามารถในการเลือกจับลดลงเช่นกันแต่กรดอะมิโนนี้ไม่ได้อยู่ในตำแหน่งย่อยเหมือนกับ Trp275 ดังนั้นการเปลี่ยนกรดอะมิโนจึงไม่มีผลกระทบกับอัตราการย่อย ผลรวมของการกลายพันธุ์ก็ทำให้สายน้ำตาลโคโตโอลิโกแซคคาไรด์ซับซ้อนมาทางด้านปลายนอนรีดิวซ์ได้และอาจจับกับตำแหน่งจับแบบยืดหยุ่นมากขึ้นทำให้โอกาสที่พันธะไกลโคซิดิกของน้ำตาลที่ตำแหน่งต่างๆ จะพบกับตำแหน่งย่อยได้มากขึ้นผลคือทำให้ผลิตภัณฑ์ในการย่อยหลากหลายสปีชีส์ตั้งแต่ NAG-NAG<sub>5</sub> ดังแสดงในตารางที่ 4 และทำให้ค่าคงที่ทางจลนพลศาสตร์เปลี่ยนไปด้วยโดยไปเพิ่มค่า  $k_{cat}$  ของการสลายน้ำตาล pentaNAG และ hexaNAG เป็น 8 และ 60 เท่าตามลำดับ (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 ค่าจลนพลศาสตร์ของการสลายสับสเตรทไคโตโอลิโกแซคคาร์ไรด์และไคตินของเอนไซม์ไคติเนสดั้งเดิมและเอนไซม์ไคติเนสกลายพันธุ์ (แหล่งที่มา Suginta et al., J Chem Biol, 2009)

Chitinase A	pentaNAG			hexaNAG			colloidal chitin		
	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$k_{cat}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$k_{cat}/K_m$ ( $\text{s}^{-1}\text{M}^{-1}$ )	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$k_{cat}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$k_{cat}/K_m$ ( $\text{s}^{-1}\text{M}^{-1}$ )	$K_m$ ( $\text{mg ml}^{-1}$ )	$k_{cat}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$k_{cat}/K_m$ ( $\text{s}^{-1}\text{mg ml}^{-1}$ )
Wild-type	$380 \pm 49$ (1)	0.21 (1)	$5.6 \times 10^{-4}$ (1)	$174 \pm 23$ (1)	0.19 (1)	$1.1 \times 10^{-4}$ (1)	$12 \pm 1.4$ (1)	0.10 (1)	$88 \times 10^{-4}$ (1)
W275G	$315 \pm 110$ (0.8)	0.04 (0.2)	$1.3 \times 10^{-4}$ (0.2)	$238 \pm 17$ (1.4)	0.06 (0.3)	$2.3 \times 10^{-4}$ (2.1)	$25 \pm 3.7$ (2.1)	0.02 (0.2)	$6.7 \times 10^{-4}$ (0.1)
W397F	$476 \pm 11$ (1.3)	2.11 (10)	$44 \times 10^{-4}$ (8)	$460 \pm 53$ (2.6)	3.0 (16)	$65 \times 10^{-4}$ (59)	$19 \pm 0.1$ (1.6)	0.03 (0.3)	$14 \times 10^{-4}$ (0.2)

จากตารางที่ 11 จะเห็นว่าการกลายพันธุ์ของกรดอะมิโน Trp275 และ Trp397 ให้ผลต่อค่าจลนพลศาสตร์ของการสลายไคตินต่างจากค่าจลนพลศาสตร์ของการสลายไคโตโอลิโกแซคคาร์ไรด์เนื่องจากกลไกการจับของสับสเตรททั้งสองไม่เหมือนกัน ส่วนของไคตินจะเข้าจับโดยปลายด้านรีดิวซ์จะเคลื่อนเข้าทางด้านปลายของโดเมนจับไคตินโดยการจับระหว่างสายของไคตินโพลีเมอร์กับ surface-exposed residues เช่น Tyr31, Trp70, Trp231 และ Tyr245 และ ดังนั้นกรดอะมิโนด้านปลายรีดิวซ์ เช่น Trp397 และ Trp275 จะทำหน้าที่ในการช่วยดึงสายของน้ำตาลให้เข้าสู่ substrate binding subsites จากด้าน non-reducing (-4) มายังด้านรีดิวซ์ (+2) ดังนั้นการเปลี่ยนกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง -1, +1, +2 ทำให้ลดความสามารถในการจับกับน้ำตาลด้านปลายรีดิวซ์และทำให้เอนไซม์มี processivity ต่อสับสเตรทน้อยลง ข้อสันนิษฐานนี้สอดคล้องกับผลการจลนพลศาสตร์ของการสลายไคตินด้วยโปรตีนกลายพันธุ์ W275G และ W397F ให้ค่า  $K_m$  เพิ่มขึ้น ส่วนค่า  $k_{cat}$  ลดลงอย่างมาก

### 3.4 . การศึกษาโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ไคติเนส เอ และเอนไซม์กลายพันธุ์ E315M ในสถานะที่ไม่มีสับสเตรทกับมีสับสเตรท

ผู้วิจัยและทีมงานได้ทำการศึกษากการตกผลึกเอนไซม์ดั้งเดิมของไคติเนส เอ และ เอนไซม์ไคติเนส เอ กลายพันธุ์ E315M ที่มีสับสเตรทกับที่มีสับสเตรท  $\text{NAG}_5$  และ  $\text{NAG}_6$  โดยผลึกโปรตีนที่ได้สามารถหักเหรังสีเอ็กซ์ได้ดีในช่วง 2.0-1.7 อังสตรอม หลังจากเก็บข้อมูลและการหาโครงสร้างเบื้องต้นและโครงสร้างอย่างละเอียดโดยวิธี molecular replacement ขอได้ค่าทางสถิติและค่าการทำ refinement ของโครงสร้างสี่โครงสร้างคือ 1) wild-type; 2) E315M; 3) E315M+ $\text{NAG}_5$ ; และ 4) E315M+ $\text{NAG}_6$  โดยค่าทางสถิติและค่าการทำ refinement แสดงไว้ในตารางที่ 12

ตารางที่ 12 ค่าทางสถิติและค่าการทำ refinement ของโครงสร้างเอนไซม์ไคตินเนสดั้งเดิม และเอนไซม์กลายพันธุ์ (แหล่งที่มา Songsiriritthigul et al., J Struct Biol, 2008)

Statistics of data and structural refinement				
Crystal	Wild-type	E315M	E315M+NAG <sub>5</sub>	E315M+NAG <sub>6</sub>
<b>Data collection statistics</b>				
PDB code	3B8S	3B9E	3B9D	3B9A
Space group	P1	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>
Unit-cell parameters	a = 60.27 Å	a = 63.96 Å	a = 63.51 Å	a = 63.70 Å
	b = 64.28 Å	b = 83.11 Å	b = 83.08 Å	b = 83.32 Å
	c = 83.52 Å	c = 106.98 Å	c = 105.59 Å	c = 106.57 Å
	$\alpha = 91.74^\circ$	$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$
	$\beta = 91.18^\circ$			
	$\gamma = 112.91^\circ$			
Resolution range <sup>a</sup> (Å)	24.62–2.11 (2.00)	24.68–1.79 (1.70)	24.54–1.81 (1.72)	30–1.90 (1.80)
Solvent content (%)	46.9	44.85	43.70	44.55
Unique reflections	73693 (10404)	61563 (7880)	59561 (8247)	53131 (7564)
Observed reflections	292719 (41321)	607216 (59894)	406849 (45783)	452556 (63380)
Multiplicity	4.0 (4.0)	9.9 (7.6)	6.8 (5.6)	8.5 (8.4)
Completeness (%)	94.6 (91.9)	97.2 (87.2)	99.2 (95.6)	99.7 (99.0)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	19.5 (5.5)	26.9 (4.5)	26.3 (9.9)	26.3 (6.1)
$R_{\text{merge}}^{a,b}$ (%)	6.6 (22.8)	7.1 (36.1)	7.1 (12.3)	7.0 (31.2)
<b>Refinement statistics</b>				
$R_{\text{factor}}^c$ (%)	16.8	18.9	18.7	18.1
$R_{\text{free}}^{d,e}$ (%)	20.5	21.9	21.5	21.0
No. of amino acid residues	1134	581	567	567
No. of protein atoms	8708	4474	4353	4353
No. of carbohydrate atoms	—	—	57	85
No. of ordered waters	1091	740	664	690
<b>R.M.S. deviations</b>				
Bond length	0.007	0.006	0.006	0.006
Bond angle	0.968	0.932	0.962	0.990
<b>Mean atomic</b>				
B values Protein atoms	14.45	15.10	14.24	13.74
Substrate	—	—	19.82	21.79
Waters	24.46	25.69	24.92	25.42
Overall	16.19	16.60	15.70	15.45

<sup>a</sup> Values in parentheses refer to the corresponding values of the highest resolution shell.

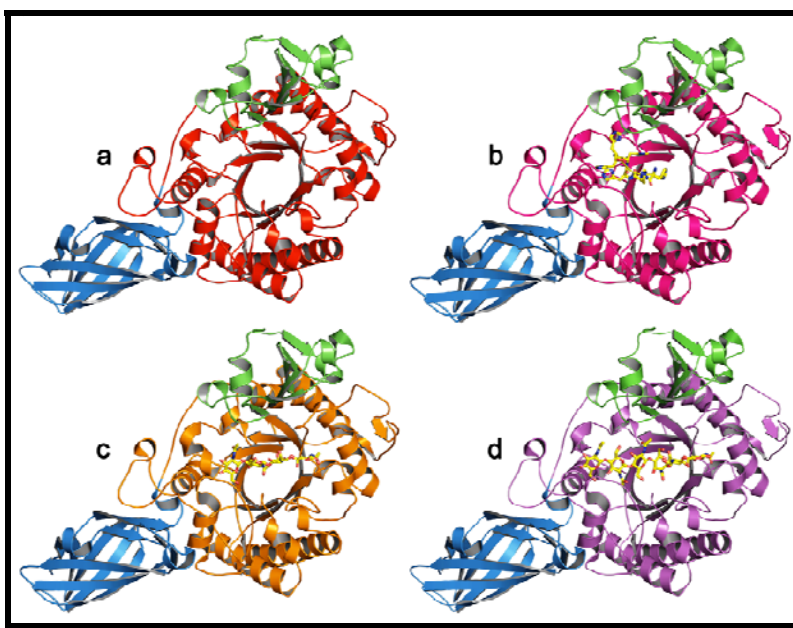
<sup>b</sup>  $R_{\text{merge}} = \frac{\sum_{hkl} \sum_i |I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle|}{\sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)}$  where  $I_i$  is the intensity for the  $i$ th measurement of an equivalent reflection with indices  $hkl$ .

<sup>c</sup>  $R_{\text{factor}} = \frac{\sum |F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}|}{\sum F_{\text{obs}}}$  where  $F_{\text{obs}}$  and  $F_{\text{calc}}$  are the observed and calculated structure-factors.

<sup>d</sup>  $R_{\text{free}} = \frac{\sum |F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}|}{\sum F_{\text{calc}}}$  calculated from 5% of the reflections selected randomly and omitted from the refinement process.

โครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ ไคตินเนส เอ จากเชื้อ *V. harveyi* ทั้งหมดสี่โครงสร้างคือ รูปที่ 12a เอนไซม์ไคตินเนส wild-type รูปที่ 12b โครงสร้างไคตินเนส เอ กลายพันธุ์ E315M ที่ไม่มีสับสเตรท พบกรดอะมิโน (His)<sub>6</sub> ด้าน C-terminus ของเอนไซม์ที่ทำ genetic engineering เข้าไปเพื่อช่วยในการทำบริสุทธิ์แบบจำเพาะฝังอยู่ที่บริเวณเร่งและจับกับกรดอะมิโนหลาย ๆ ตัวที่ทำหน้าที่จับกับสับสเตรท ส่วนรูปที่ 12c โครงสร้างเชิงซ้อนของไคตินเนส เอ กลายพันธุ์ E315M+NAG<sub>5</sub> พบโครงสร้างของน้ำตาล NAG<sub>5</sub> แบบสายตรงและพบหน่วยของน้ำตาลเพียงสี่หน่วย ส่วนน้ำตาลหน่วยสุดท้ายไม่สามารถหา electron density พบ คาดว่าน้ำตาลหน่วยนี้มีโครงสร้างที่ไม่ rigid แต่แกว่งไปแกว่งมาได้ ส่วนรูปที่ 12d แสดงโครงสร้างเชิงซ้อนของไคตินเนส เอ กลายพันธุ์ E315M+NAG<sub>6</sub> พบโครงรูปแบบของน้ำตาลทั้งหกหน่วยที่จับกับบริเวณ โครงสร้างทั่วไปของเอนไซม์ไคตินเนส เอ จากเชื้อ *V. harveyi* ประกอบด้วยสามโดเมนหลักคือ 1) โดเมนจับไคตินที่ปลายด้านเอ็น (the N-terminal chitin binding domain, ChBD) ประกอบด้วยกรดอะมิโนที่ 22-138 โดเมนนี้ประกอบด้วยสายปี้ด้าเป็นหลักและทำหน้าที่เกี่ยวกับการนำไคตินสายยาวเข้าสู่บริเวณเร่ง; 2) โดเมนเร่งปฏิกิริยา (Catalytic domain, Cat) โดเมนนี้เชื่อมกับโดเมนจับไคตินด้วย hinge สันที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนที่ 139-159 โดเมนเร่งปฏิกิริยามีสองโดเมนย่อยคือ Cat I (กรดอะมิโนที่ 160-460)

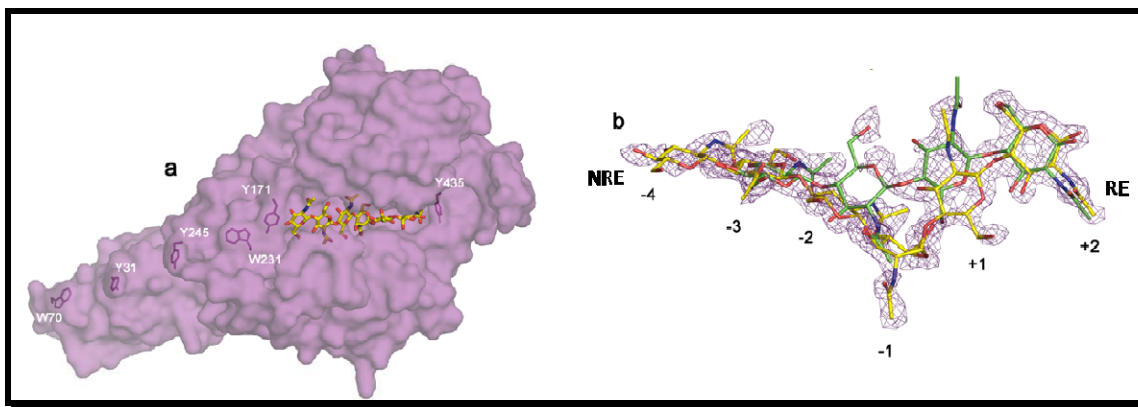
และ Cat II (กรดอะมิโนที่ 548-588) มารวมกันเป็นสายปี้ด้าและสายอัลฟาอย่างละ 8 สายมาสร้างโครงสร้างที่เรียกว่า  $(\alpha/\beta)_8$  TIM barrel ที่มีบริเวณเร่งอยู่ และ 3) โดเมนแทรกขนาดเล็ก (small insertion domain) ประกอบด้วยกรดอะมิโนที่ 461-547 มาสร้างเป็นโครงสร้าง  $\alpha+\beta$  ที่แทรกระหว่างโดเมนเร่งปฏิกิริยาย่อย Cat I และ Cat II บางครั้งเรียกโดเมนนี้ว่า small  $\alpha+\beta$  insertion domain ยังไม่ทราบหน้าที่ที่แน่นอนของโดเมนนี้



รูปที่ 12 โครงสร้างการ์ตูนของเอนไซม์ประกอบด้วยสามโดเมนหลัก โดเมนจับไคติน (สีน้ำเงิน)โดเมนเร่งปฏิกิริยา TIM barrel สีแดงสำหรับ wild-type (a) สีชมพูสำหรับ mutant E315M (b) สีส้มสำหรับ E315M + NAG<sub>5</sub> (c) และสีม่วงสำหรับ E315M+NAG<sub>6</sub> (d) และโดเมนแทรกขนาดเล็ก (สีเขียว) (แหล่งที่มา Songsiriritthigul et al., J Struct Biol, 2008)

การวิเคราะห์โครงสร้างเชิงซ้อนของเอนไซม์ไคติเนส เอ กลายพันธุ์กับสับสเตรท NAG<sub>6</sub> (รูปที่ 13a,b) พบว่าบริเวณเร่งของเอนไซม์มีลักษณะยาวลึกประกอบด้วยบริเวณจับกับน้ำตาลทั้งหมดหกหน่วย โดยกำหนดบริเวณจับกับน้ำตาล GlcNAc แต่ละตำแหน่งเริ่มตำแหน่ง -4, -3, -2, -1, +1, +2 ตามลำดับ โดยที่ตำแหน่ง -4 อยู่ที่ด้านนอกบริเวณที่อยู่อ่ด้านในของบริเวณเร่งส่วนตำแหน่ง +2 อยู่ทางด้านในบริเวณที่ด้านนอกของบริเวณเร่ง บริเวณ +1 และ +2 เป็นบริเวณจับของน้ำตาลผลิตภัณฑ์ได้หลังการย่อยสับสเตรท ส่วนตำแหน่งตัดหรือ cleavage site อยู่ระหว่างตำแหน่ง -1 กับ +1

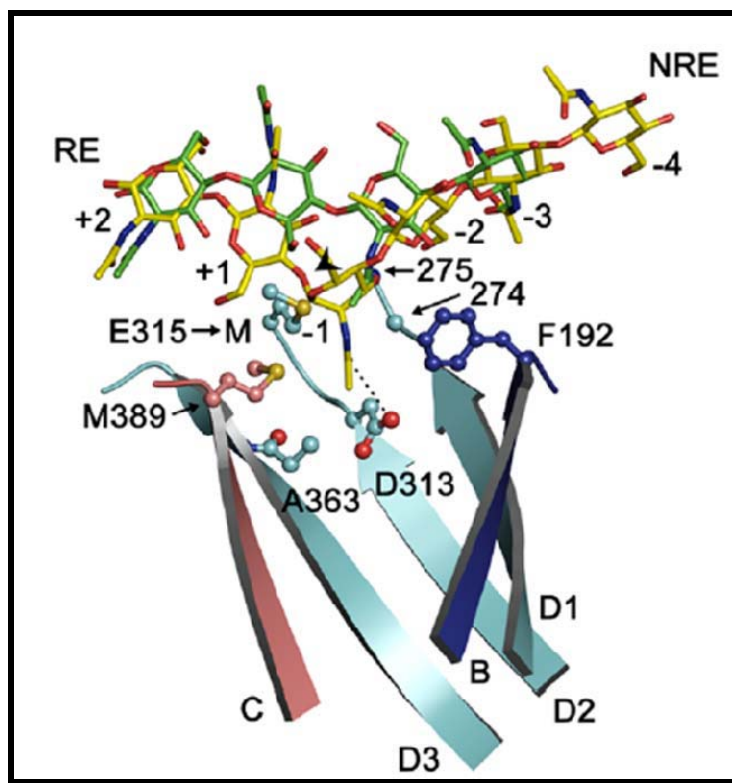




รูปที่ 13 โครงสร้างเชิงซ้อน E315M + NAG6 (แหล่งที่มา Songsiriritthigul et al., J Struct Biol, 2008)

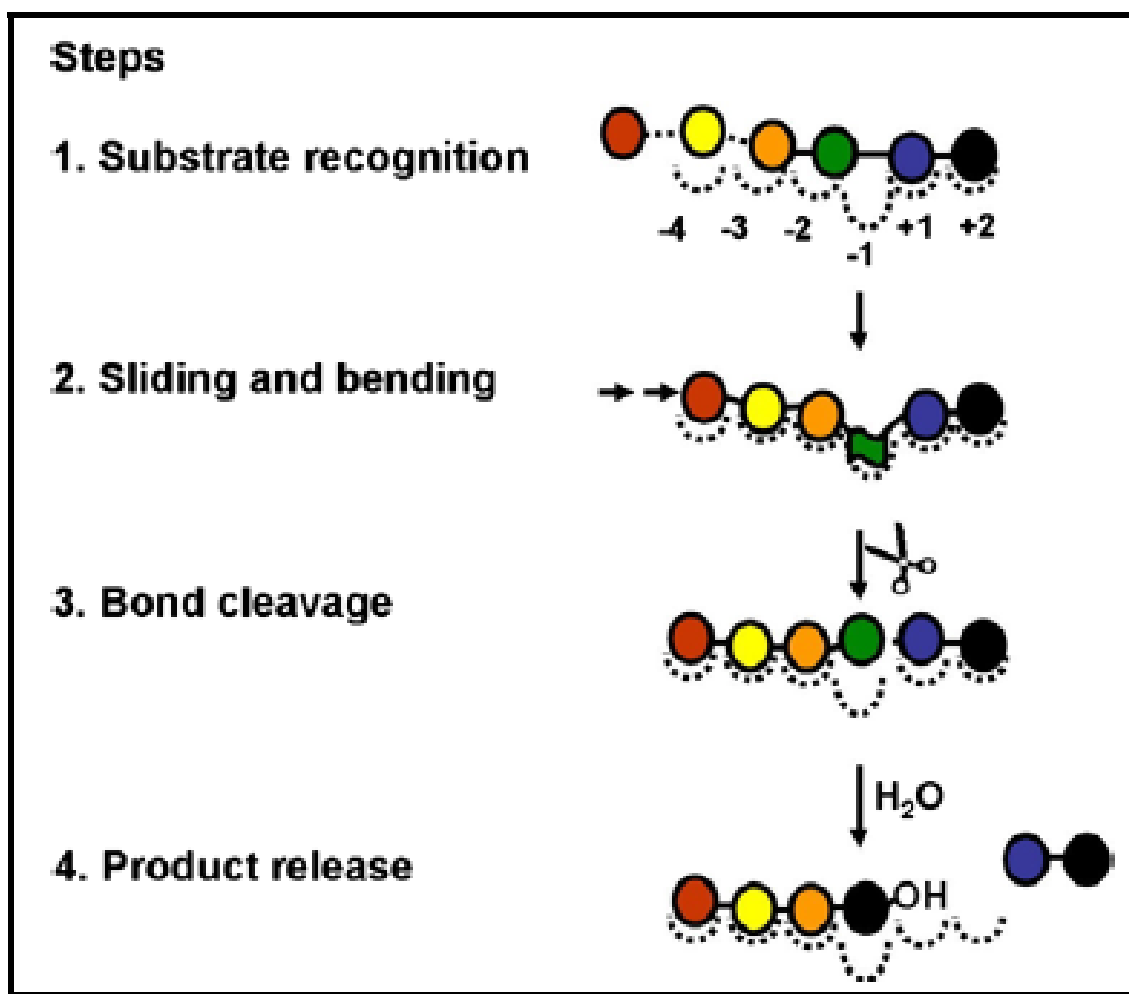
- (a) Surface representation แสดงลักษณะของบริเวณเร่งที่มีน้ำตาลหกหน่วยจับอยู่เต็มที่ (โครงสร้าง stick มีอะตอมของคาร์บอนแสดงด้วยสีเหลือง อะตอมของออกซิเจนแสดงด้วยสีแดง และอะตอมของไนโตรเจนแสดงด้วยสีน้ำเงิน) กรดอะมิโนวงแหวนที่เป็น surface exposed แสดงด้วยโครงสร้างแบบ stick (สีม่วง)
- (b) โครงสร้างของน้ำตาล NAG<sub>5</sub> เทียบกับ NAG<sub>6</sub> ที่บริเวณเร่ง ที่ตำแหน่งจับ -4 ถึง +2

จากโครงสร้างพบกรดอะมิโนวงแหวนที่สำคัญต่อการจับกับโคตินที่อยู่ผิวของเอนไซม์ได้แก่ Tyr31 Trp70 Trp231 และ Tyr245 จากการทำการเปลี่ยนกรดอะมิโนเหล่านี้พบว่ากรดอะมิโน Trp70 มีบทบาทสำคัญที่สุดในการจับกับสับสเตรทสายยาว (Pantoom et al., 2008) ส่วนกรดอะมิโน Tyr171 และ Tyr435 ที่ปลายด้าน NRE และ RE ตามลำดับ น่าจะเกี่ยวข้องกับการจำกัดการวางตัวของน้ำตาลโคโตโอลิโกแซคคาไรด์เนื่องจากตำแหน่งของกรดอะมิโนทั้งสองที่อยู่ปลายทั้งสองด้านของ substrate binding cleft ผลการทดลองที่ได้จากแผนที่ Fo-Fc และ 2Fo-Fc พบว่าน้ำตาล NAG<sub>5</sub> จับในลักษณะโครงสร้างตรงและพบหน่วยน้ำตาลเพียงสี่หน่วยที่จับกับตำแหน่ง -3 -2 +1 และ +2 โดยไม่พบว่ามีน้ำตาลจับอยู่ที่ตำแหน่ง -1 เลย ส่วนน้ำตาล NAG<sub>6</sub> พบโครงสร้างแบบงอและมีการบิดของพันธะ  $\beta 1 \rightarrow 4$  ไกลโคซิดิกที่เชื่อมระหว่างน้ำตาล -1 กับน้ำตาล +1 ไป 90 °C ทำให้ระยะทางระหว่างพันธะนี้ลดลงจาก 5 อังสตรอมจากโครงสร้างตรง เหลือเพียง 3 อังสตรอมในโครงสร้างงอ ดังแสดงในรูปที่ 14



รูปที่ 14 โครงรูปของน้ำตาล NAG5 เทียบกับน้ำตาล NAG6 ใน substrate binding cleft ของเอนไซม์โคติเนสกลายพันธุ์ E315M (แหล่งที่มา Songsiriritthigul et al., J Struct Biol, 2008)

นอกจากนี้พบน้ำตาลที่ตำแหน่ง -1 ในโครงรูปแบบ half chair ซึ่งเป็นรูป transition state ของการเร่งปฏิกิริยาถูกดึงลงมาอยู่ที่ด้านล่างของ binding cleft และถูกตรึงด้วยกรดอะมิโนที่สำคัญคือ Asp313 ด้วยพันธะไฮโดรเจน จากผลการวิเคราะห์ที่ได้ทำให้ได้ข้อสรุปว่าน้ำตาลน่าจะเข้าจับที่ตำแหน่งจับกับสับสเตรทด้วยโครงรูปตรง จึงเรียกโครงรูปนี้ว่า recognition conformation โครงรูปนี้ไม่สามารถถูกย่อยสลายได้ ต่อมาน้ำตาลมีการเปลี่ยนโครงรูปเป็นรูปงอทำให้พันธะไฮโดรเจนระหว่างน้ำตาล -1 กับ +1 เข้าไปใกล้กรดอะมิโนที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยา คือ Glu315 มากทำให้เกิดปฏิกิริยาการสลายพันธะผ่านกลไกการส่งโปรตอนได้ เรียกโครงรูปนี้ว่า bent conformation ผลการทดลองที่ได้จากการศึกษาโครงสร้างเชิงซ้อนของเอนไซม์ทำให้ทำนายกลไกการสลายโคตินของโคติเนส เอ ว่าน่าจะเกิดผ่าน 'slide and bend' ซึ่งประกอบด้วย 4 ขั้นตอนดังแสดงในรูปที่ 15 ดังนี้



รูปที่ 15 กลไกการเร่งปฏิกิริยาตามข้อเสนอแบบ slide-and-bend (แหล่งที่มา Songsiriritthigul et al., J Struct Biol, 2008)

ขั้นตอนการจับกับสลายสับสเตรท 4 ขั้นตอน

1. การจับ (recognition) ขั้นตอนนี้สับสเตรทเข้าจับในโครงรูปตรงหรือ recognition conformation
2. การเลื่อนและงอ (Slide and bend) มีการเคลื่อนของสายน้ำตาลจากทางด้านอนรีดิวิธ โดยปลายด้านรีดิวิธถูกตรึงด้วยกรดอะมิโนที่สำคัญต่อการเลือกจับของสับสเตรทสองตัวคือ Trp275 และ Trp397 (Suginta et al., 2007) ทำให้เกิดโครงรูปงอของน้ำตาล
3. การตัดพันธะ (bond cleavage) การงอของสายน้ำตาลทำให้พันธะไกลโคซิดิกที่ตำแหน่ง -1 และ +1 เข้ามาใกล้กรดอะมิโน Glu315 ทำให้เกิดการส่งโปรตอนและการสลายของพันธะ
4. การหลุดของผลิตภัณฑ์น้ำตาล (Product release) การตัดพันธะทำให้ได้น้ำตาล NAG2 เป็นผลิตภัณฑ์ที่ตำแหน่ง +1 และ +2 หลังจากน้ำเข้าทำปฏิกิริยาตาม retaining mechanism (Papanikolau et al., 2001; Bortone et al., 2002; Sasaki et al., 2002) จะได้ผลิตภัณฑ์น้ำตาลที่เป็นปีต้าอะโนเมอร์

#### 4. สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ได้ทำการสร้างโคติเนสกลายพันธุ์โดยการเปลี่ยนกรดอะมิโนวงแหวนที่บริเวณจับกับสับสเตรทและกรดอะมิโนที่ผิวของเอนไซม์โดยทำการเปลี่ยนกรดอะมิโน Trp70 Trp168 Tyr171 Trp231 Tyr245 Trp275 Trp397 และ Trp570 โดยเทคนิค site-directed mutagenesis การทดสอบหาค่า specific hydrolyzing activity ของการสลาย  $pNP-[GlcNAc]_2$  และ colloidal chitin เปรียบเทียบกับโปรตีน wild-type พบว่าโปรตีนกลายพันธุ์ที่กรดอะมิโนวงแหวนมีความสามารถย่อย  $pNP-glycoside$  และ colloidal chitin ได้น้อยกว่าโปรตีน wild-type เอนไซม์กลายพันธุ์ W397F เป็นตัวเดียวที่ให้ค่า specific activity ของการย่อยสับสเตรททั้งสองตัวมากกว่า wild-type การตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการสลายโคตินและโคโตโอลิโกแซคคาร์ไรด์ตั้งแต่ 2-6 หน่วย ( $NAG_2-NAG_6$ ) พบว่าโคติเนสกลายพันธุ์ W275G และ W397F ได้เปลี่ยนแปลงรูปแบบการสลายน้ำตาลโคโตโอลิโกแซคคาร์ไรด์ไปจากรูปแบบของเอนไซม์ wild-type อย่างสิ้นเชิง ผลการทดลองสรุปได้ว่ากรดอะมิโน Trp275 และ Trp397 น่าจะมีความสำคัญต่อการเลือกจับของน้ำตาลโคโตโอลิโกแซคคาร์ไรด์ ส่วนผลของการกลายพันธุ์ของกรดอะมิโนที่อยู่ทีบริเวณผิวโปรตีน พบว่า Trp70 ซึ่งอยู่ที่ปลายด้านเอ็นของโดเมนจับโคตินมีบทบาทสำคัญต่อการจับและการสลายโคตินสายยาว ส่วนกรดอะมิโน Trp231 และ Tyr245 ซึ่งอยู่ใกล้กับปลายมีผลต่อการสลายโคตินแต่ไม่มีผลต่อการจับกับโคตินสายยาว และกรดอะมิโนทั้งหมดไม่มีบทบาทสำคัญต่อการจับและการสลายโคโตโอลิโกแซคคาร์ไรด์สายสั้น ๆ

การศึกษาลักษณะการจับของเอนไซม์กับโคโตโอลิโกแซคคาร์ไรด์เทียบกับโคตินโดยเทคนิค quantitative HPLC MS พบว่าสับสเตรท  $NAG_5$  และ  $NAG_6$  ชอบที่จะจับกับบริเวณเร่งที่ตำแหน่งจับ -2 ถึง +2 ส่วนโคตินสายยาวเริ่มต้นจับทั้งแบบสุ่มและแบบ progressive แต่ผลิตผลน้ำตาล  $NAG_2$  ที่พบมากกว่าน้ำตาลสายสั้นอื่น ๆ แสดงว่าเอนไซม์สลายโคตินสายยาวแบบ progressive จากการวิเคราะห์โดย HPLC MS ทำให้ทราบว่าเอนไซม์ wild-type ไม่มีการเลือกใช้สับสเตรทส่วนเอนไซม์กลายพันธุ์ W397F และ W275G เลือกสลาย  $\beta$  สับสเตรทมากกว่า  $\alpha$  สับสเตรท งานวิจัยส่วนสุดท้ายคือการศึกษาโครงสร้างผลึกโคติเนส เอ ซีโครงสร้าง คือโคติเนสดั้งเดิม โคติเนสกลายพันธุ์ E315M E315M+ $NAG_5$  และ E315M+ $NAG_6$  ที่ความละเอียดที่ 2.0-1.7 อังสตรอม โครงสร้างโดยรวมของเอนไซม์มีความคล้ายคลึงกับเอนไซม์โคติเนส เอ จาก *S. marcescens* ประกอบด้วยสามโดเมนคือ โดเมนจับโคติน โดเมนเร่งปฏิกิริยาและโดเมนแทรกขนาดเล็ก โครงสร้างของ E315M+ $NAG_5$  แสดงน้ำตาลสายตรงของสี่หน่วยของน้ำตาลเพนตะเมอร์จับที่บริเวณ -3,-2,+1,+2 โดยไม่พบน้ำตาลที่บริเวณจับ -1 ส่วนโครงสร้าง E315M+ $NAG_6$  แสดงโครงรูปของน้ำตาลเฮกซะเมอร์ที่จับเต็มทีบริเวณ -4 ถึง +2 โครงสร้างเชิงซ้อนของเอนไซม์ E315M+ $NAG_5$  และ E315M+ $NAG_6$  ทำให้ทราบว่าน้ำตาลน่าจะมีการเปลี่ยนโครงรูปเพื่อทำให้การสลายพันธะไกลโคซิดิกเกิดขึ้นได้ โดยการเปลี่ยนโครงรูปน่าจะเกิดผ่านกลไก “slide-and-bend”

## เอกสารอ้างอิง

- Aronson, NA, Halloran, B.A, Alexyev MF, Amable L, Madura JD, Pasupulati L, Worth C & van Roey P (2003) *Biochem. J.* 376, 87-95
- Bassler BL, Yu C., Lee YC & Roseman S (1991) *J. Biol. Chem.* 266, 2476-2486.
- Boller T, Gehri A, Mauch F & Vogeli U (1983) *Planta* 157, 22-31.
- Bortone K, Monzingo AF, Ernst S & Robertus JD (2002) *J. Mol. Biol.* 320, 293-302.
- Bradford MM (1976) *Anal Biochem* 72:248-254.
- Bruce A, Srinivasan U, Staines HJ & Highley TL (1995) *Int Biodeterior Biodegrad.* 35:337-353.
- Cabib E (1987) *Adv. Enzymol. Related Areas Mol. Biol.* 59-101.
- Cohen-Kupiec R & Chet I (1998) *Curr. Opin. Biotechnol.* 9, 270-277.
- Collaborative Computational Project, Number 4 (1994) 760-763.
- Davis B & Eveleigh DE (1984) In Chitin, Chitosan, and Related enzymes (Zakikas, J.P., ed.) Academic Press, New York. 160-179.
- Gooday GW (1994) In C. Ratledge (ed.) In Biochemistry of microbial degradation. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. 279-312.
- Gooday GW (1999) *EXS.* 87,157-69.
- Henrissat B & Bairoch A (1993) *Biochem. J.* 316, 695-696.
- Hollis T, Monzingo AF, Bortone K, Ernst S, Cox R & Robertus JD (2000) *Protein Sci.* 9, 544-551.
- Ikegami T, Okada T, Hashimoto M, Seino S, Watanabe T & Shirakawa M (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 13654-13661.
- Imai T, Watanabe T, Yui T, Sugiyama J (2002) *FEBS Lett* 510, 201-205.
- Itoh Y, Watanabe J, Fukada H, Mizuno R, Kezuka Y, Nonaka T & Watanabe T. (2006) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72 (2006) 1176-1184.
- de Jong AJ, Cordewener J, lo Schiavo F, Terzi M, Vandekerckhove J, van Kammen A & de Vries SC (1992) *Plant Cell* 4, 425-433.
- Jones TA, Zou JY, Cowan SW, Kjeldgaard M (1991) *Acta Crystallogr.* A47, 110-119.
- Katouno F, Taguchi M, Sakurai K, Uchiyama T, Nikaidou N, Nonaka T, Sugiyama J & Watanabe T (2004) *J. Biochem. (Tokyo)* 136,163-168.
- Kuranda M & Robbins PW (1991) *J. Biol. Chem.* 266, 19758-19767.
- Laemmli UK (1970) *Nature* 227,680-685.
- Laskowski RA, MacArthur MW, Moss DS, Thornton JM (1993) *J. Appl. Crystallog.* 26, 283-291.

- Leslie AGW (1991) Newsletters on Protein Crystallography. SERC Laboratory, Daresbury, Warrington, WA44AD, UK
- Montgomery MT & Kirchman DL (1993) *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 373-379.
- Murshudov GN, Vagin AA, Dodson EJ (1997) *Acta Crystallog.* D53, 240–255.
- Navaza J (1994) *Acta Crystallog.* sect. A50, 157-163.
- Ohno T, Armand S, Hata T, Nikaidou N, Henrissat B, Mitsutomi M & Wanatabe T (1996) *J. Bacteriol.* 178, 5065-5070.
- Pantoom S, Songsiriritthigul C, Suginta W (2008) *BMC Biochem* 21, 9:2
- Papanikolau Y, Prag G, Tavlak G, Vorgias CE, Oppenheim AB & Petratos K (2001) *Biochemistry*, 40, 11338-11343.
- Papavizas CG (1985) *Ann. Rev. Phytopathol.* 23, 23-54.
- Perrakis A, Tews I, Dauter Z, Oppenheim AB, Chet I, Wilson KS & Vorgias CE (1994) *Structure* 2, 1169-1180.
- Pleban S, Chernin L & Chet I (1997) *Lett Appl. Microbiol.* 25, 284-288.
- Robertus JD & Monzingo AF (1999). *EXS.* 87,125-135.Sasaki, C., Yokoyama, A., Itoh, Y., Hashimoto M, Watanabe T & Fukamizo T (2002) *J. Biochem. (Tokyo)* 131, 557-564.
- Sivan A & Chet I (1989) *J. Gen. Microbiol.* 135, 675-682.
- Songsiriritthigul C, Pantoom S, Aguda AH, Robinson RC & Suginta W (2008) *J Struct Biol* 162,491-499.
- Spindler-Barth M (1993) In *Chitin Enzymology* (Muzzarelli, R.A.A., ed.), European Chitin Society, Italy, 75-82.
- Srivastava AK, Defago G & Boller T (1985) *Experientia.* 41, 1612-1613.
- Suginta W (2007) *Enzyme Microb Tech.* 41,212-220.
- Suginta W, Robertson P A W, Austin B, Fry SC & Fothergill-Gilmore L A (2000) *J. Appl. Microbiol.* 89, 76-84.
- Suginta W, Vongsuwan A, Songsiriritthigul C, Prinz H, Estibeiro P, Duncan RR, Svasti J & Fothergill-Gilmore L.A (2004) *Arch. Biochem. Biophys.* 424, 171-180.
- Suginta W, Vongsuwan A, Songsiriritthigul C, Svasti J & Prinz H (2005) *FEBS J.* 272, 3376-3386.
- Suginta W, Songsiriritthigul C, Kobdaj A, Opassiri R, Svasti J (2007) *Biochim. Biophys. Acta* 177, 1151-1160.
- Suginta W, Pantoom S & Prinz H (2009) *J Chem Biol*, available online May7, 2009.

- Suzuki K, Taiyoji M, Sugawara N, Nikaidou N, Henrissat B & Watanabe T (1999) *Biochem J.* 343, 587-596.
- Terwisscha van Scheltinga, A.C., Hennig, M. & Dijkstra, B.W. (1996) *J. Mol. Biol.* 262, 243-257.
- Watanabe T, Ishibashi A, Ariga Y, Hashimoto M, Nikaidou N, Sugiyama J, Matsumoto T & Nonaka T (2001) *FEBS Lett.* 494,74-78.
- Uchiyama T, Katouno F, Nikaidou N, Nonaka T, Sugiyama J & Watanabe T. (2001) *J. Biol. Chem.* 276,41343-41349.
- Watanabe T, Ariga Y, Sato U, Toratani T, Hashimoto M, Nikaidou N, Kezuka Y, Nonaka T & Sugiyama J. (2003) *Biochem J.* 376,237-244.
- Wills-Karp M & Karp CL (2004) *N. Engl. J. Med.* 351, 1455-1457.
- Yu C, Lee AM, Bassler BL & Roseman S (1991) *J. Biol. Chem.* 266, 24260-24267.

## ภาคผนวก ก

### ผลงานนำเสนอในที่ประชุมระดับนานาชาติและระดับนานาชาติ

1. Sritho N, Songsiriritthigul C & **Suginta W**. Mutational analysis of the reducing-end binding residues of chitinase A from *Vibrio harveyi*. 3<sup>rd</sup> Annual Symposium of the Protein Society of Thailand “Frontiers in Protein Research”, Chulabhorn Research Institute Conference Center, Bangkok, August 28<sup>th</sup>-29<sup>th</sup>, 2008. P50, *Poster presentation*.
2. Pantoom S, Prinz H & **Suginta W**. Identification of novel inhibitors of chitinase A from *Vibrio harveyi* using a high-throughput screening approach. 3<sup>rd</sup> Annual Symposium of the Protein Society of Thailand “Frontiers in Protein Research”, Chulabhorn Research Institute Conference Center, Bangkok, August 28<sup>th</sup>-29<sup>th</sup>, 2008. P48, *Poster presentation*.
3. Pantoom S, Songsiriritthigul C & **Suginta W**. Crystallization of wild-type chitinase A and mutants (W275G and W397F) from *Vibrio harveyi* in complex with potential inhibitors. 3<sup>rd</sup> Annual Symposium of the Protein Society of Thailand “Frontiers in Protein Research”, Chulabhorn Research Institute Conference Center, Bangkok, August 28<sup>th</sup>-29<sup>th</sup>, 2008. P46, *Poster presentation*.
4. **Suginta W** & Prinz H. Substrate binding preference and anomer selectivity of *Vibrio carchariae* chitinase A as revealed by HPLC-MS. 2<sup>nd</sup> Annual Symposium of the Protein Society of Thailand “Odysseys in Protein Research”, Chulabhorn Research Institute Conference Center, Bangkok, September 20<sup>th</sup>-21<sup>st</sup>, 2007. P14, *Invited oral presentation*.
5. Songsiriritthigul C, Kobdaj A & **Suginta W**. The active site residues Trp275 and Trp397 are important for the binding selectivity of chitinase A to soluble substrates. 2<sup>nd</sup> Annual Symposium of the Protein Society of Thailand “Odysseys in Protein Research”, Chulabhorn Research Institute Conference Center, Bangkok, September 20<sup>th</sup>-21<sup>st</sup>, 2007. P53. *Poster presentation*.
6. Pantoom S, Songsiriritthigul C & **Suginta W**. The influence of the surface-exposed residues on the binding and hydrolytic activities of *Vibrio carchariae* chitinase A. 2<sup>nd</sup>



Annual Symposium of the Protein Society of Thailand “Odysseys in Protein Research”, Chulabhorn Reserch Institute Conference Center, Bangkok, September 20<sup>th</sup>-21<sup>st</sup>, 2007. P27. *Poster presentation*.

7. Pantoom S, Songsiriritthigul C & **Suginta W**. The effect of the *N*-terminal residues on the enzymatic properties of *Vibrio carchariae* chitinase A. 1<sup>st</sup> Annual Symposium of the Protein Society of Thailand “Challenges in Protein Research in Thailand”, Chulabhorn Reserch Institute Conference Center, Bangkok, October 24-25<sup>th</sup>, 2006. P61. *Poster presentation*.
8. Songsiriritthigul C, Aguda A, Robinson RC & **Suginta W**. Structural analysis of *Vibrio carchariae* chitinase A reveals conformational changes during substrate hydrolysis. 1<sup>st</sup> Annual Symposium of the Protein Society of Thailand “Challenges in Protein Research in Thailand”, Chulabhorn Reserch Institute Conference Center, Bangkok, October 24-25<sup>th</sup>, 2006. P19. *Oral presentation*.
9. Songsiriritthigul C, Aguda A, Robinson RC & **Suginta W**. Structure of chitinase A from *Vibrio carchariae*. 2<sup>nd</sup> Protein Crystallization Workshop. Synchrotron Research Center, Nakhon Ratchasima, 20 – 23 July 2006. *Invited oral presentation by SC*.
10. Songsiriritthigul C, Vongsuwan A, Krittanai C & **Suginta W** Active-site mutation alters substrate specificity of chitinase A from *Vibrio carchariae*. 2<sup>nd</sup> Protein Symposium Network, Chulabhorn Research Institute, Bangkok, Thailand, September 23<sup>th</sup>-24<sup>th</sup>, 2005. *Invited oral presentation*.
11. Songsiriritthigul C, Vongsuwan A, Krittanai C & **Suginta W** A study of substrate specificity of chitinases A from *Vibrio carchariae*. 31<sup>st</sup> Congress on Science and Technology of Thailand at Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, 18 – 20 October 2005. P327. *Oral presentation*.

## ภาคผนวก ข

### ผลงานตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ

1. **Suginta W**, Pantoom S & Prinz H (2009) Substrate binding modes and anomer selectivity of chitinase A from *Vibrio harveyi*. *J Chem Biol* (online available May7, 2009).
2. Songsiriritthigul C, Pantoom S, Aguda AH, Robinson RC & **Suginta W** (2008) Crystal structures of *Vibrio harveyi* chitinase A complexed with chitooligosaccharides: Implications for the catalytic mechanism. *J. Struct Biol* 162, 491-499.
3. Pantoom S, Songsiriritthigul C & **Suginta W** (2008) The effects of the surface-exposed residues on the binding and hydrolytic activities of *Vibrio carchariae* chitinase A. *BMC-Biochemistry*, 9:2.
4. **Suginta W**, Songsiriritthigul C, Kobdaj A, Opassiri R & Svasti J (2007) Mutations of Trp275 and Trp397 altered the binding selectivity of *Vibrio carchariae* chitinase A. *BBA - General Subjects* 1770, 1151-1160.

# Mutations of Trp275 and Trp397 altered the binding selectivity of *Vibrio carchariae* chitinase A

Wipa Suginta<sup>a,\*</sup>, Chomphunuch Songsiriritthigul<sup>a,b</sup>, Archara Kobdaj<sup>a</sup>,  
Rodjana Opassiri<sup>a</sup>, Jisnusun Svasti<sup>c</sup>

<sup>a</sup> School of Biochemistry, Institute of Science, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima 30000, Thailand

<sup>b</sup> National Synchrotron Research Center, P.O. Box 93, Nakhon Ratchasima 30000, Thailand

<sup>c</sup> The Department of Biochemistry and Center for Protein Structure and Function, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok, Thailand

Received 7 November 2006; received in revised form 19 March 2007; accepted 22 March 2007

Available online 4 April 2007

## Abstract

Point mutations of the active-site residues Trp168, Tyr171, Trp275, Trp397, Trp570 and Asp392 were introduced to *Vibrio carchariae* chitinase A. The modeled 3D structure of the enzyme illustrated that these residues fully occupied the substrate binding cleft and it was found that their mutation greatly reduced the hydrolyzing activity against *p*NP-[GlcNAc]<sub>2</sub> and colloidal chitin. Mutant W397F was the only exception, as it instead enhanced the hydrolysis of the *p*NP substrate to 142% and gave no activity loss towards colloidal chitin. The kinetic study with the *p*NP substrate demonstrated that the mutations caused impaired *K<sub>m</sub>* and *k<sub>cat</sub>* values of the enzyme. A chitin binding assay showed that mutations of the aromatic residues did not change the binding equilibrium. Product analysis by thin layer chromatography showed higher efficiency of W275G and W397F in G4–G6 hydrolysis over the wild type enzyme. Though the time course of colloidal chitin hydrolysis displayed no difference in the cleavage behavior of the chitinase variants, the time course of G6 hydrolysis exhibited distinct hydrolytic patterns between wild-type and mutants W275G and W397F. Wild type initially hydrolyzed G6 to G4 and G2, and finally G2 was formed as the major end product. W275G primarily created G2–G5 intermediates, and later G2 and G3 were formed as stable products. In contrast, W397F initially produced G1–G5, and then the high-*M<sub>r</sub>* intermediates (G3–G5) were broken down to G1 and G2 end products. This modification of the cleavage patterns of chitooligomers suggested that residues Trp275 and Trp397 are involved in defining the binding selectivity of the enzyme to soluble substrates.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Active-site mutation; Chitin hydrolysis; Chitinase A; Chitooligosaccharide; Specific hydrolyzing activity; Thin layer chromatography; *Vibrio carchariae*

## 1. Introduction

Chitin is a  $\beta$  (1,4)-linked homopolymer of *N*-acetylglucosamine (GlcNAc or G1) and mainly found as a structural component of fungal cell walls and the exoskeletons of invertebrates, including insects and crustaceans. A complete hydrolysis of chitin usually requires three classes of glycosyl hydrolases. Endochitinases (EC 3.2.1.14) act randomly on chitin to give chitooligomers, then chitobioses ([GlcNAc]<sub>2</sub> or

G2) as the main products. Chitobioses (EC 3.2.1.52 or formally EC 3.2.1.30) and *N*-acetyl- $\beta$ -hexosaminidases (EC 3.2.1.52) further hydrolyze the dimers and chitooligomers to yield *N*-acetylglucosamine (GlcNAc or G1) as the final product. Chitinases occur in a wide range of organisms, including viruses, bacteria, fungi, insects, higher plants, and humans. The presence of chitinases in such organisms is closely related to the physiological roles of their substrates. For example, bacteria express chitinases that enable them to utilize chitin biomass as the sole source of carbon and nitrogen [1], whilst chitinases in fungi are thought to have autolytic, nutritional and morphogenetic functions [2]. In insects, chitinases are essential in the moulting process, and may also affect gut physiology through their involvement in peritrophic membrane turnover [3]. Plant chitinases mainly act as biological control agents against fungal

**Abbreviations:** Gn,  $\beta$ -1–4 linked oligomers of GlcNAc residues where *n*=1–6; *p*NP-(GlcNAc)<sub>2</sub>, 4-nitrophenyl *N,N'*-diacetyl- $\beta$ -D-chitobioside; TLC, thin-layer chromatography; DMAB, *p*-dimethylaminobenzaldehyde; IPTG, isopropyl thio- $\beta$ -D-galactoside; PMSF, phenylmethylsulphonylfluoride

\* Corresponding author. Tel.: +66 44 224313; fax: +66 44 224193.

E-mail address: [wipa@sut.ac.th](mailto:wipa@sut.ac.th) (W. Suginta).

pathogens and invading insects [4,5], while viral chitinases are involved in pathogenesis of host cells [6]. Chitinases in some vertebrates are mainly produced as part of their digestive tract and may also utilize the enzymes in their defense against pathogenic fungi and some parasites. Human chitinases are particularly associated with anti-inflammatory effect against the T helper-2 driven diseases, such as allergic asthma [7,8].

Chitin is the second most prominent polymer only after cellulose. Thus, the enzymatic degradation of chitin waste using chitinases has recently received much attention as an environmentally-friendly alternative to chemical methods. Chitin derivatives are highly biocompatible and offer a diverse range of applications in areas such as biomedicine, nutrition, food processing, and cosmetics. Chitinase A is a major chitinase produced at high levels by certain soil-born and marine bacteria. This enzyme could potentially serve as an efficient catalyst for the bioconversion of chitin into valuable derivatives for commercial use.

We previously reported the isolation of chitinase A from a Gram-negative marine bacterium, *Vibrio carchariae*, and the DNA that encodes the *Chi A* gene [9,10]. On the basis of amino acid sequence similarities, this  $M_r$  63000 enzyme is classified as a member of family 18 chitinases [11]. Like other family-18 microbial enzymes [12–14], the catalytic domain of *V. carchariae* enzyme comprises two short sequence regions, which form an  $(\alpha/\beta)_8$ -TIM barrel active site. A completely conserved acidic amino acid (Glu315) located at the end of the conserved motif DxxDxDxE (in the  $\beta_4$  strand) is likely to be the catalytic residue [10]. The action of native chitinase A on chitin initially released a series of small chitooligomeric fragments, which were further hydrolyzed to G2 as the end product, suggesting that the enzyme acts as an endochitinase [15]. The retention of the  $\beta$  over  $\alpha$  anomer of all the products observed at initial time of the reactions is in agreement with the substrate-assisted mechanism employed by the enzyme. As suggested by molecular simulation and X-ray structures of the family 18 glycosyl hydrolases [16–19], the catalytic acid equivalent to Glu315 is presumed to donate a proton to the glycosidic oxygen, which leads to a distortion of the sugar molecule at the scissile position into a boat conformation. The resultant bond cleavage yields an oxazolinium intermediate and the retention of anomeric configuration in the products. The higher affinity of *V. carchariae* chitinase A for higher  $M_r$  chitooligosaccharides [15] suggested that the catalytic cleft of the enzyme comprises an array of most probably six binding subsites, comparable to that of CiX1 from *Coccidioides immitis* [20,21] and chitinase A (SmchiA) from *Serratia marcescens* [12,22].

A number of studies using site-directed mutagenesis of *Bacillus circulans* chitinase A1, *S. marcescens* 2170 chitinase A and B, and *Streptomyces griseus* chitinase C [23–26] suggested several surface exposed aromatic residues that were important for guiding the chitin chain to the catalytic cleft so that effective catalysis can take place. The effects of the active-site aromatic residues of *B. circulans* chitinase A1 on chitin hydrolysis were also well studied by Watanabe's group [27]. Since the amino acid alignment indicated that certain aromatic residues of *V. carchariae* chitinase A including Tyr171, Trp168, Trp275,

Trp397 and Trp570 are linearly aligned with the aromatic residues at the binding cleft of *B. circulans* chitinase A1 and of *S. marcescens* chitinase A, this research has employed site-directed mutagenesis to investigate the roles of these aromatic residues on the binding and hydrolytic activities of the enzyme towards insoluble chitin and soluble chitooligosaccharides.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Bacterial strains and chemicals

*Escherichia coli* type strain DH5 $\alpha$  was used for routine cloning, subcloning and plasmid preparation. Supercompetent *E. coli* XL1Blue (Stratagene, La Jolla, CA, USA) was the host strain for the production of mutagenized DNA. *E. coli* type strain M15 (Qiagen, Valencia, CA, USA) and the pQE 60 expression vector harboring *chitinase A* gene fragments were used for a high-level expression of recombinant chitinases. Chitooligosaccharides (G1–G6) and *p*NP-glycosides were obtained from Seikagaku Corporation (Bioactive Co., Ltd., Bangkok, Thailand). Flake chitin from crab shells was product of Sigma-Aldrich Pte Ltd., The Capricorn, Singapore Science Park II, Singapore). QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit including Pfu Turbo DNA polymerase was purchased from Stratagene. Aluminum sheets (Silica gel 60F<sub>254</sub>, 20  $\times$  20 cm) for thin-layer chromatography (TLC) were obtained from Merck Co. (Berlin, Germany). Restriction enzymes and DNA modifying enzymes were products of New England Biolabs, Inc. (Beverly, MA, USA). All other chemicals and reagents (analytical grade) were obtained from the following sources: reagents for bacterial media (Scharlau Chemie S.A., Barcelona, Spain.); chitin from crab shells and all chemicals for protein preparation and thin-layer chromatography (Sigma-Aldrich Pte Ltd., Singapore and Carlo Erba Reagenti SpA, Limite, Italy).

### 2.2. Homology modeling

The putative amino acid sequence of the mature *V. carchariae* chitinase A was submitted to Swiss-Model (<http://swissmodel.expasy.org/>) for the tertiary structure prediction using the X-ray structure of *S. marcescens* chi A E315L mutant complex with hexaNAG (G6) (PDB code: 1NH6) as structural template. The predicted structure was viewed and edited with Pymol ([www.pymol.org](http://www.pymol.org)). The residues at the substrate binding cleft of *V. carchariae* chitinase A were located by superimposing 459 residues of *V. carchariae* chitinase A with the equivalent residues of *S. marcescens* chi A mutant docked with G6 coordinates, using the program Superpose available in the CCP4 suit [28].

### 2.3. Mutant design and site-directed mutagenesis

Point mutations were introduced to the wild-type *chitinase A* DNA that was previously cloned into the pQE expression vector by PCR technique [10], using the QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit, according to the Manufacturer's protocols. Active-site chitinase A variants were generated using oligonucleotides synthesized from Proligo Pte Ltd. (Helios, Singapore) and Bio Service Unit (BSU) (Bangkok, Thailand). Oligonucleotide sequences used for site-directed mutagenesis are listed in Table 1. Single mutants (W168G, Y171G, W275G, W397F, W570G and D392N) were constructed using the DNA fragment encoding wild-type chitinase A as template. A double mutant (W397F/W570G), a triple mutant (W397F/W570G/W275G), and a quadruple mutant (W397F/W570G/W275G/Y171G) were produced using mutants W570G, W397F/W570G, and W397F/W570G/W275G, respectively, as DNA templates.

The success of newly-generated mutations was confirmed by automated DNA sequencing (BSU, Thailand). The programs used for nucleotide sequence analyses were obtained from the DNASTAR package (DNASTAR, Inc., Madison, USA).

### 2.4. Protein expression and purification

The DNA fragment that encodes wild-type chitinase A (amino acid residues 22–597, without the 598–850 C-terminal fragment) was cloned into

Table 1  
Primers used for mutagenesis

Name	DNA template	Sequence <sup>a</sup>
W168G	<i>Chitinase A</i> wild-type	forward 5'-CTTATTTTGGTGAAGGAGGCATCTACGG-3' reverse 5'-CCGTAGATGCCTCCTTCAACAAAATAAG-3'
Y171G	<i>Chitinase A</i> wild-type	forward 5'-GAATGGGGCATCGGAGGTCGTGATTACAC-3' reverse 5'-GTGTAATCACGACCTCCGATGCCCCATTCC-3'
W275G	<i>Chitinase A</i> wild-type	forward 5'-CATCTATCGGTGGTGGAAACAC TTT CTGAC-3' reverse 5'-GTCAGAAAAGTGTTCACACCCGATAGATG-3'
D392N	<i>Chitinase A</i> wild-type	forward 5'-CTTTGCGATGACTTACAACCTTCTACGGCGG-3' reverse 5'-CAGCCGCCGTAGAAGTTGTAAGTCATCGCAAAG-3'
W397F	<i>Chitinase A</i> wild-type	forward 5'-GACTTCTACGGCGGCTTCAACAACGTTCC-3' reverse 5'-GGAACGTTGTTGAAGCCGCCGTAGAAGTC-3'
W570G	<i>Chitinase A</i> wild-type	forward 5'-GCAGGTCTATTCTCTGGAGAGATTGATGC-3' reverse 5'-GCATCAATCTCTCCAGAGAATAGACCTGC-3'
Double mutant	W570G mutant	forward 5'-GACTTCTACGGCGGCTTCAACAACGTTCC-3' reverse 5'-GGAACGTTGTTGAAGCCGCCGTAGAAGTC-3'
Triple mutant	double mutant	forward 5'-CATCTATCGGTGGTGGAAACAC TTT CTGAC-3' reverse 5'-GTCAGAAAAGTGTTCACACCCGATAGATG-3'
Quadruple mutant	triple mutant	forward 5'-GAATGGGGCATCGGAGGTCGTGATTACAC-3' reverse 5'-GTGTAATCACGACCTCCGATGCCCCATTCC-3'

<sup>a</sup> Sequences underlined indicate mutated codons.

the pQE60 expression vector and highly expressed in *E. coli* M15 cells as the 576-amino acid fragment with a C-terminal (His)<sub>6</sub> sequence [10]. For recombinant expression, the cells were grown at 37 °C in Luria Bertani (LB) medium containing 100 µg/ml ampicillin until OD<sub>600</sub> of the cell culture reached 0.6. After that, the cell culture was cooled down on ice to 25 °C before chitinase expression was induced by the addition of isopropyl thio-β-D-galactoside (IPTG) to a final concentration of 0.5 mM. Cell growth was continued at 25 °C for 18 h, and the cell pellet was collected by centrifugation at 4500×g for 30 min. The freshly-prepared cell pellet was resuspended in 40 ml of lysis buffer (20 mM Tris–HCl buffer, pH 8.0, containing 150 mM NaCl, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), and 1.0 mg/ml lysozyme), then lysed on ice using a Sonopuls Ultrasonic homogenizer with a 6-mm-diameter probe (50% duty cycle; amplitude setting, 20%; total time, 30 s, 6–8 times). Unbroken cells and cell debris were removed by centrifugation at 12,000×g for 1 h. The supernatant was immediately applied to a Ni-NTA agarose affinity column (1.0×10.0 cm) (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany), and the chromatography was carried out gravitationally at 25 °C, following the Qiagen's protocol. After loading, the column was washed with 100 ml of loading buffer (20 mM Tris–HCl buffer, pH 8.0) containing 5 mM imidazole, followed by another 50 ml of 10 mM imidazole in the loading buffer. Ni-NTA-bound proteins were then eluted with 250 mM imidazole in the same buffer. Eluted fractions of 0.5 ml were collected and 6 µl of each fraction was analyzed on a 12% SDS-PAGE, according to the method of Laemmli [29], to confirm purity. Fractions that possessed chitinase activity were pooled and then subjected to several rounds of membrane centrifugation using Vivaspinn-20 ultrafiltration membrane concentrators (*M<sub>r</sub>* 10,000 cut-off, Vivascience AG, Hannover, Germany) for a complete removal of imidazole. A final concentration of the protein was determined by Bradford's method [30] using a standard calibration curve constructed from BSA (0–25 µg). The freshly-prepared proteins were either immediately subjected to functional characterization or stored at –30 °C in the presence of 15% glycerol until used.

## 2.5. Chitinase activity assays

Chitinase activity was determined by colorimetric assay using pNP-[GlcNAc]<sub>2</sub> as substrate or by reducing sugar assay using colloidal chitin as substrate. The pNP assay was determined in a 96-well microtiter plate and a 100-µl assay mixture contained protein sample (10 µl), 500 µM pNP-(GlcNAc)<sub>2</sub> (25 µl), and 100 mM sodium acetate buffer, pH 5.0 (65 µl). The reaction mixture was incubated at 37 °C for 10 min with constant agitation, then the enzymatic reaction was terminated by the addition of 50 µl 1.0 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. The amount of

*p*-nitrophenol (pNP) released was determined spectrophotometrically at 405 nm in a microtiter plate reader (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The molar concentrations of pNP were calculated from a calibration curve constructed with varying pNP from 0 to 30 nmol.

The reducing sugar assay was carried out by modifying the chitinase microassay protocol developed by Bruce et al. [31]. The reaction mixture (400 µl), containing 20 mg of colloidal chitin (prepared based on Hsu and Lockwood, 1975 [32]) in 0.1 M sodium acetate buffer, pH 5.0 and 80 µg chitinase A, was incubated at 37 °C with shaking in a Thermomixer comfort (Eppendorf AG, Hamburg, Germany). After 60 min, the reaction was terminated by boiling at 100 °C for 5 min, and then centrifuged at 2795×g for 5 min to precipitate the remaining chitin. A 150-µl supernatant was transferred to a new tube, to which was added 30 µl of 0.8 M potassium tetraborate, followed by boiling for 3 min. After cooling, 900 µl of a freshly prepared *p*-dimethylaminobenzaldehyde (DMAB) solution was added and then incubated at 37 °C for 20 min. A release of reducing sugars was detected by measuring the absorbance at 585 nm (*A*<sub>585</sub>). Specific hydrolyzing activity against colloidal chitin was calculated by converting *A*<sub>585</sub> to µmoles of reducing sugars using a standard calibration curve constructed with varying G2 from 0 to 4.0 µmol.

## 2.6. Circular Dichroism (CD) spectroscopy

The purified chitinases were diluted to 0.40 to 1.40 mg/ml in 20 mM Tris/HCl buffer, pH 8.0. CD spectra over three scans were measured using a Jasco J-715 spectropolarimeter (Japan Spectroscopic Co., Japan) at near UV (190 to 250 nm) regions. CD measurements were performed at 25 °C with a scan speed of 20 nm/min, 2 nm bandwidth, 100 mdeg sensitivity, an average response time of 2 s and an optical path length of 0.2 mm. The baseline buffer for all the proteins was 20 mM Tris/HCl buffer, pH 8.0. The baseline was measured and subtracted from each spectrum before the raw data were transformed to mean residue ellipticity (MRE) using the equation:  $[\Theta] = (73.33 \text{ m}^\circ)/([\text{prot}]_{\text{mM}} l_{\text{cm}} n)$ , where  $[\Theta]$  is the MRE in deg cm<sup>2</sup> d/mol, *n* is the number of amino acids in the polypeptide chain, *m*<sup>°</sup> is the measured ellipticity, and *l* is the path length in centimeters. The intensity of JASCO standard CSA (non-hygroscopic ammonium (+)-10-camphorsulfonate) at wavelength 290 nm was about 45 units. Therefore, the conversion factor was calculated to be 3300/CSA intensity at 290 nm or 73.33 using the equation above. The molecular weight of each protein was calculated from number of amino acids×mean residue weight. After noise reduction and concentration adjustment, the measured ellipticity was converted to the molar ellipticity, which was plotted versus wavelength.



## 2.7. Kinetic measurements

Kinetic studies of chitinase A mutants were performed by colorimetric assay in a microtiter plate reader (Applied Biosystems, USA). The reaction mixture (100  $\mu$ l), containing 0–500  $\mu$ M *p*NP-(GlcNAc)<sub>2</sub>, dissolved in 100 mM sodium acetate buffer, pH 5.0, and dH<sub>2</sub>O, was pre-incubated at 37 °C for 10 min. After the enzyme (400 ng) was added, the reaction was continued for additional 10 min at 37 °C and then terminated with 50  $\mu$ l of 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Release of *p*-nitrophenol (*p*NP) was monitored at *A*<sub>405</sub>, which was subsequently converted to molar quantities using a calibration curve of *p*NP (0–30 nmol). The kinetic values (*K*<sub>m</sub>, *V*<sub>max</sub>, and *k*<sub>cat</sub>) were evaluated from three independent sets of data by the nonlinear regression function of the GraphPad Prism software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA).

## 2.8. Chitin binding assay

Chitin binding studies were carried out using flake chitin prepared from crab shells (Sigma-Aldrich Pte Ltd., Singapore). Fine particles of insoluble chitin were suspended in dH<sub>2</sub>O to yield 10 mg/ml stock solution (the suspension was continuously stirred with a magnetic stirrer in order to obtain consistent amounts when pipetting). A reaction mixture (2.0 ml), containing 2.5 mg/ml flake chitin and 200  $\mu$ g/ml chitinase in 100 mM sodium acetate buffer, pH 5.0, was shaken continuously at 4 °C. At different time points (0, 5, 10, 15, 30, 60, 90, 120, and 180 min), a 150- $\mu$ l aliquot was taken and spun twice in a microcentrifuge at 9660 $\times$ g for 3 min to precipitate the chitin particles. Then the unbound chitinase A remaining in the supernatant was measured spectrophotometrically at 280 nm (*A*<sub>280</sub>).

## 2.9. Product analysis by thin-layer chromatography

Hydrolysis of chitooligosaccharides (G2–G6) by wild-type and mutants D392N, W168G, Y171G, W275G, and W397F was carried out in a 80- $\mu$ l reaction mixture, containing 0.1 M sodium acetate buffer, pH 5.0, 2.5 mM substrate and 800 ng purified enzyme. The reaction was incubated at 30 °C with shaking for 60 min, and then terminated by boiling for 5 min. For product analysis, each reaction mixture was applied five times (one  $\mu$ l each) to a silica TLC plate (7.0 $\times$ 10.0 cm), and then chromatographed three times (1 h each) in a mobile phase containing n-butanol: methanol: 28% ammonia solution: H<sub>2</sub>O (10:8:4:2) (v/v), followed by spraying with aniline-diphenylamine reagent and baking at 180 °C for 3 min [33].

In the time course of G6 hydrolysis by wild-type, W275G and W397F were measured in the same way as described for the hydrolysis of G2–G6, but the reaction was incubated at 30 °C at interval times of 2, 5, 10, 15, 30, 60 min, and 18 h prior to termination. Examination of the time course of chitin hydrolysis by the three chitinase variants was carried out in a 400- $\mu$ l reaction mixture, containing 0.1 M sodium acetate buffer, pH 5.0, 20 mg colloidal chitin, and 80  $\mu$ g purified enzyme. The reaction was incubated at 30 °C at the same time intervals as for G6 hydrolysis, and then terminated by boiling for 5 min. Products released from the reactions were subsequently analyzed by TLC using the conditions described above.

# 3. Results and discussion

## 3.1. Sequence analysis and homology modeling

A comparison of the deduced amino acid sequence of *V. carchariae* chitinase A with seven other family-18 chitinases suggested that Glu315 and Asp392 are completely conserved (data not shown). However, we previously employed site-directed mutagenesis to demonstrate that only Glu315 was important for catalysis [15]. The alignment also showed that five aromatic residues, including Trp168, Tyr171, Trp275, Tyr435, and Trp570 in the sequence of *V. carchariae* chitinase A are linearly aligned with the equivalent aromatic residues of

other bacterial sequences. Trp397 is the only residue for which phenylalanine is replaced in the sequences of *S. marcescens*, *B. cepacia*, and *A. punctata*. In an attempt to locate these amino acids in the structure of *V. carchariae* chitinase A, its 3D-structure was modeled based on the X-ray structure of *S. marcescens* Chi A E315L mutant complexed with G6 (see Materials and methods). The target residues, which extend over the substrate binding cleft at the top of the TIM-barrel domain, are shown in Fig. 1A.

Fig. 1B displays the superimposition of the active site of *V. carchariae* chitinase A on that of *S. marcescens* Chi A E315L mutant. It can be seen that Trp168, Tyr171, Trp231, Trp 275, Tyr435, Trp570, Glu315 and Asp392 of the *Vibrio* enzyme completely overlay Trp167, Tyr170, Phe232, Trp275, Trp539, Glu315 and Asp391, respectively, of the *Serratia* enzyme with an R.M.S. value of 0.032 Å. In contrast, Trp397 overlaid Phe396 residue of the *Serratia* enzyme with the orientation of their hydrophobic faces lying perpendicular to each other.

Since the positions of the binding cleft residues of *V. carchariae* and *S. marcescens* chitinases were nearly identical, most of the conformations of the sugar rings bound in the catalytic cleft of the template's structure are likely to be adopted by the modeled structure. Based on this assumption, Tyr171 is likely to be located at the edge of the binding cleft beyond subsite –4 (the non-reducing end), whereas Trp168, Trp570, and Trp275 should stack against the pyranosyl rings of GlcNAc units at subsites –3, –1, and +1, respectively. Trp397 should be located near the GlcNAc unit at subsite +2 (the reducing end). The presence of Glu315 at the scissile bond between the GlcNAcs at subsites –1 and +1 seems to explain the catalytic role of this residue. Asp392 appears to be further away from the cleavage site, but in close contact with the GlcNAcs at subsites +1 and +2. This supports our previous finding that this residue did not play a direct role in catalysis [15].

## 3.2. Recombinant expression, purification and secondary structure determination

To investigate the influence of Tyr171, Trp168, Trp275, Trp397, Trp570 on the binding and hydrolytic activities of *V. carchariae* chitinase A, these residues were mutated using PCR-based site-directed mutagenesis. Replacement of Asp392 with Asn was previously described by Suginta et al. [15]. After confirming the genetic modification of the target bases by automatic DNA sequencing, the recombinant proteins were highly expressed in *E. coli* M15 host cells. The six histidine residues tagged at the C-terminus allowed the proteins to be readily purified using Ni-NTA agarose affinity chromatography. SDS/PAGE analysis showed that the purified proteins migrated to ~63 kDa (Fig. 2A). This molecular weight corresponded well to that of wild-type. The yields obtained from this expression system were approx. 10–15 mg of highly purified protein per liter of bacterial culture.

Prior to further investigating the effects of point mutations on the binding and hydrolytic activities, the folding states of the *E. coli* expressed chitinase A were examined by means of CD spectroscopy. Fig. 2B shows that the spectra of the mutated

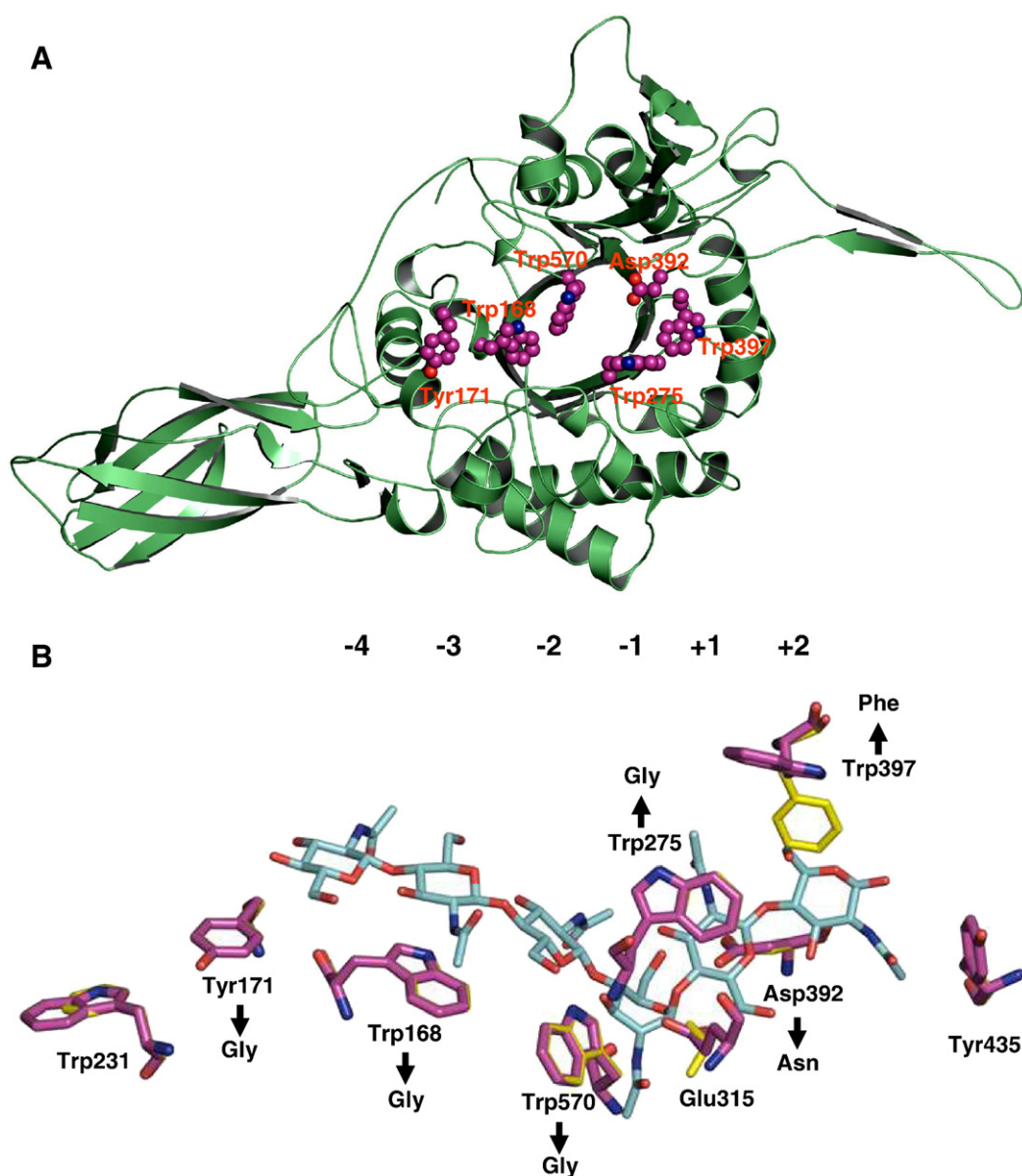


Fig. 1. The Swiss-Model 3D-structure of *V. carchariae* chitinase A. (A) A ribbon representation of the 3D-structure of *V. carchariae* chitinase A (in green) was modeled based on the X-ray structure of *S. marcescens* Chi A E315L mutant as described in the text. The target aromatic residues (in magenta) that line within the substrate-binding cleft are shown in space-filling model. (B) A stick model of the putative binding cleft of *V. carchariae* chitinase A (in magenta) was superimposed on that of *S. marcescens* Chi A E315L mutant (in yellow) complexed with G6 (in cyan). N atoms are shown in blue and O atoms are shown in red.

proteins nicely overlaid the spectrum of the wild-type. This demonstrated the overall similarity of the conformations of mutated and non-mutated enzymes.

### 3.3. Effects of the mutations on the chitin binding equilibrium and the specific hydrolyzing activity of chitinase A

Initial studies of the chitin binding activity of single mutants were performed using flake chitin prepared from crab shells. To minimize hydrolysis of the enzyme bound to the chitin substrate, the assay mixture was maintained at 4 °C throughout the experiment. For each reaction, a decrease in the concentration of the unbound enzyme was monitored at

various time points as indicated in Materials and methods. The results (Fig. 3) showed that the binding behaviors of wild-type enzyme and mutants W168G, Y171G, W275G, and W397F were indistinguishable. In general, the binding process took place quite rapidly, and reached equilibrium within 15 min. However, a difference was seen with mutant D392N for which the binding took a much longer time, about 60 min, to reach equilibrium. Apparently, mutations of the aromatic side chains did not markedly affect the binding equilibrium.

When the specific hydrolyzing activity of the different chitinase variants towards *p*NP-[GlcNAc]<sub>2</sub> and colloidal chitin were examined (Table 2), similar results were seen

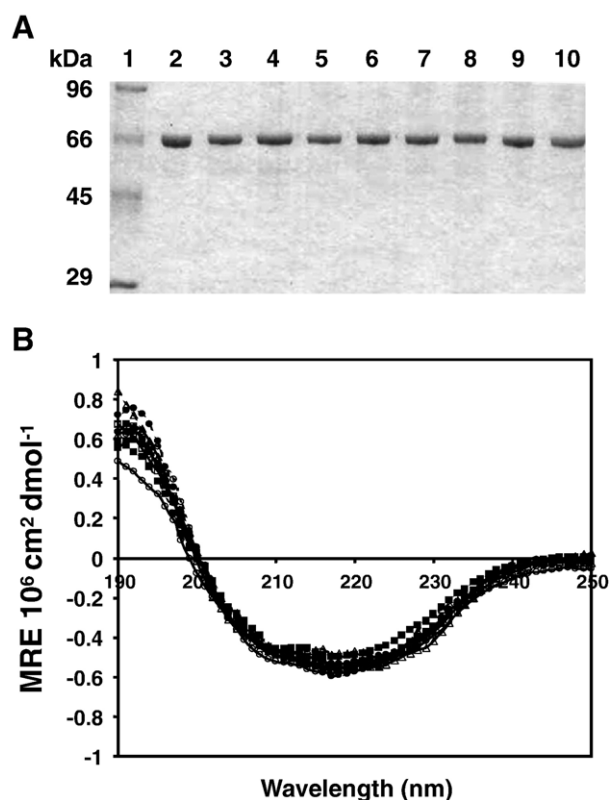


Fig. 2. SDS / PAGE analysis and CD spectra of chitinase A variants. (A) Purified chitinases (2  $\mu$ g) were electrophoresed using 12% SDS/PAGE gel and then were stained with Coomassie blue. (B) Chitinase A and its mutants were purified by Ni-NTA agarose affinity chromatography, and then dialyzed extensively to remove imidazole. The proteins were solubilized in 20 mM Tris/HCl buffer, pH 8.0 to final concentrations of 0.40 to 1.40 mg/ml. CD spectra of chitinase variants were obtained with a Jasco J-715 spectropolarimeter. A solution of 20 mM Tris/HCl, pH 8.0 was used for background subtraction. Symbols: —○—, wild-type; —□—, D392N; —△—, W168G; —●—, Y171G; —■—, W275G; —▲—, W397F; ---○---, W570G; ---□---, double mutant; ---△---, triple mutant; and ---●---, quadruple mutant.

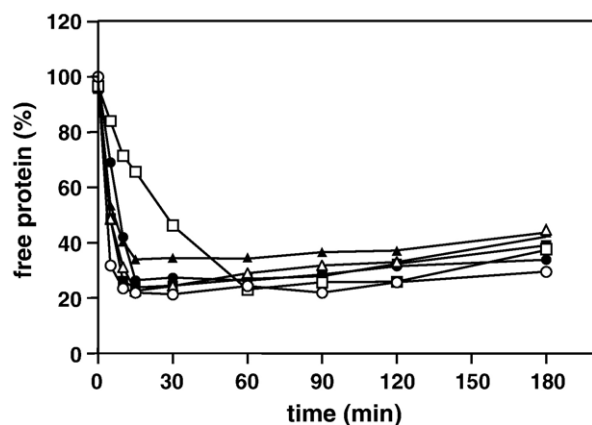


Fig. 3. Time-course studies of binding of chitinase A and mutant enzymes to colloidal chitin. Chitinases (200  $\mu$ g/ml in 100 mM sodium acetate buffer, pH 5.0) were incubated with 2.5 mg/ml flake chitin at 4 °C to minimize chitin hydrolysis. Decreases in free enzyme concentration were monitored at different time points from 0 to 180 min by measuring  $A_{280}$ . Each data value was calculated from triplicate experiments. Symbols: ○, wild-type; □, D392N; △, W168G; ●, Y171G; ■, W275G; and ▲, W397F.

Table 2

Specific hydrolyzing activity of chitinase A and mutants against *p*NP-[GlcNAc]<sub>2</sub> and colloidal chitin

Chitinase A variant	Specific hydrolyzing activity	
	( $\times 10^{-3}$ $\mu$ mol <i>p</i> NP/min/ $\mu$ g) <sup>a</sup>	( $\mu$ mol reducing sugars/min/ $\mu$ g) <sup>b</sup>
Wild-type	1.84 $\pm$ 0.05 (100) <sup>c</sup>	1.99 $\pm$ 0.018 (100)
D392N	0.61 $\pm$ 0.09 (33.4)	n.d. <sup>d</sup>
W168G	0.24 $\pm$ 0.03 (13.0)	n.d.
Y171G	0.36 $\pm$ 0.00 (19.5)	n.d.
W275G	0.20 $\pm$ 0.00 (11.1)	0.10 $\pm$ 0.001 (5.0)
W397F	2.61 $\pm$ 0.08 (141.8)	2.04 $\pm$ 0.061 (102.5)
W570G	0.11 $\pm$ 0.00 (5.6)	n.d.
Double mutant (W570G/W397F)	0.10 $\pm$ 0.002 (5.5)	n.d.
Triple mutant (W570G/W397F/W275G)	0.01 $\pm$ 0.001 (0.6)	n.d.
Quadruple mutant (W570G/W397F/W275G/Y171G)	0.01 $\pm$ 0.001 (0.6)	n.d.

For colorimetric assay A 100- $\mu$ l assay mixture, containing 400 ng chitinase, 500  $\mu$ M *p*NP-(GlcNAc)<sub>2</sub>, and 0.1 M sodium acetate buffer, pH 5.0, was incubated at 37 °C for 10 min, and then terminated by the addition of 50  $\mu$ l of 1.0 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. The amount of *p*NP released was determined by  $A_{405}$ . The  $\mu$ mol amount of *p*NP was calculated from a calibration curve of *p*NP (0–30 nmol). With the reducing sugar assay, the reaction mixture (400  $\mu$ l), containing 20 mg of colloidal chitin, 0.1 M sodium acetate buffer, pH 5.0 and 80  $\mu$ g chitinase A, was incubated at 37 °C with continuous shaking. After 60 min, the reaction was boiled at 100 °C for 5 min, and then centrifuged to remove the insoluble chitin. Release of reducing sugars was determined according to DMAB method as described in Materials and methods. The  $\mu$ mol amounts of the reducing sugars were estimated using a standard calibration curve of G2 (0–4.0  $\mu$ mol).

<sup>a</sup> Chitinase activity was measured using *p*NP-[GlcNAc]<sub>2</sub>, and release of *p*NP was detected by the colorimetric method.

<sup>b</sup> Chitinase activity was measured using colloidal chitin, and release of reducing sugars was detected by the DMAB method.

<sup>c</sup> Values in brackets represent relative activity compared to that of wild-type (set as 100).

<sup>d</sup> n.d. represents no detectable activity.

with both substrates. Mutations of Trp168, Tyr171, Trp570, and D392N completely abolished the hydrolyzing activity against colloidal chitin, and greatly reduced the hydrolyzing activity against the *p*NP substrate. As previously seen with *B. circulans* ChiA1, mutations of the equivalent aromatic residues (Trp53, Tyr56, and Trp433, respectively) to alanine also resulted in a drastic decrease in the hydrolyzing activity of *B. circulans* ChiA1, especially against crystalline  $\beta$ -chitin or colloidal chitin [27]. As proposed by Watanabe [23,27,34], Trp53 and Tyr56 (the equivalent residues of Trp168 and Tyr171 of the *Vibrio* chitinase) participate in the feeding process that brings the incoming chitin chain through the binding cleft.

At this point, it is difficult to draw a conclusion why mutations of Trp168 and Tyr171 also affected the hydrolyzing activity against the *p*NP substrate, as the [GlcNAc]<sub>2</sub> moieties could only bind to subsites –2 and –1 to allow the *p*NP aglycone to bind at subsite +1 for further cleavage.

Of all single mutants, W570G showed most severe effects on the hydrolyzing activity, having no activity against colloidal chitin and least activity (5% remaining activity) against *p*NP-[GlcNAc]<sub>2</sub>. In the modeled 3D structure (see



Table 3  
Kinetic parameters of wild-type and mutants of chitinase A

Chitinase A variants	$K_m^a$ ( $\mu\text{M}$ )	$V_{\max}$ (nmol/min/ $\mu\text{g}$ chitinase)	$k_{\text{cat}}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$k_{\text{cat}}/K_m$ ( $\text{s}^{-1} \text{M}^{-1}$ )
Wild-type	288 $\pm$ 26.0	1.94 $\pm$ 0.09	2.15	7.16 $\times 10^2$ (100) <sup>b</sup>
D392N	71 $\pm$ 5.5	0.29 $\pm$ 0.01	0.31	4.34 $\times 10^2$ (61)
W168G	278 $\pm$ 28.2	0.10 $\pm$ 0.01	0.11	3.82 $\times 10^1$ (5)
Y171G	115 $\pm$ 10.2	0.20 $\pm$ 0.001	0.21	1.85 $\times 10^2$ (26)
W275G	62 $\pm$ 10.8	0.11 $\pm$ 0.001	0.12	1.89 $\times 10^2$ (26)
W397F	315 $\pm$ 26.7	2.44 $\pm$ 0.11	2.59	8.23 $\times 10^2$ (114)

The hydrolysis of *p*NP-[GlcNAc]<sub>2</sub> at varying concentrations of 0–500  $\mu\text{M}$  was carried out with 400 ng native chitinase A in 100 mM sodium acetate buffer, pH 5.0 for 10 min at 30 °C, and then the reaction was terminated with 50  $\mu\text{l}$  of 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Release of *p*NP, monitored at A<sub>405</sub>, was converted to molar quantities using a calibration curve of *p*NP (0–30 nmol). The kinetic values ( $K_m$ ,  $V_{\max}$ , and  $k_{\text{cat}}$ ) were determined by nonlinear regression using GraphPad Prism software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA).

<sup>a</sup> Kinetic assays were performed with *p*NP-[GlcNAc]<sub>2</sub> as described in Materials and methods. Results are average of three independent experiments.

<sup>b</sup> Numbers in brackets reveal relative  $k_{\text{cat}}/K_m$  values of the generated mutants by comparing with the wild-type value (set to 100).

Fig. 1B), Trp570 was closest to the sugar ring at subsite-1. Like Trp539 in the *Serratia* structure [22], this residue is likely to be responsible for holding the GlcNAc ring at this position in place so that cleavage of the glycosidic bond between subsites –1 and +1 can occur.

Trp397 was an exception. Its mutation to Phe, instead, enhanced hydrolyzing activity towards the *p*NP substrate to 142% but increased the activity towards colloidal chitin only slightly to 102.5%. Although the elevated activity against *p*NP-[GlcNAc]<sub>2</sub> cannot be explained at this stage, the lack of change in the hydrolyzing activity towards the chitin polymer implied that Trp397 did not participate directly in the hydrolytic process.

In addition, the triple and quadruple mutants yielded non-detectable activity against colloidal chitin and less than 1% remaining activity against *p*NP-[GlcNAc]<sub>2</sub>. This may be seen as the cumulative effects of multiple point mutations on the hydrolyzing activity of *Vibrio* chitinase A.

### 3.4. Steady-state kinetics of chitinase A variants against *p*NP-[GlcNAc]<sub>2</sub>

The kinetic parameters of the hydrolytic activity of wild-type and its single mutants (except for W570G) were further explored with *p*NP-[GlcNAc]<sub>2</sub>. As shown in Table 3, the active-site modifications resulted in impairment of both  $K_m$  and  $k_{\text{cat}}$  of the enzyme. Mutants D392N, Y171G and W275G particularly reduced the  $K_m$  values to 0.24, 0.4 and 0.2 times, respectively, of the wild-type's value, while mutant W168G did not significantly change the  $K_m$  value against the *p*NP substrate. It is visible that the same mutants also greatly reduced the  $k_{\text{cat}}$  values to 5–14% of that of the wild-type. Overall, the mutations varied the  $k_{\text{cat}}/K_m$  values of the enzyme. W168G displayed the least value (5%), followed by Y171G and W275G (approx. 26%), and D392N (61%), compared to the value obtained for wild-type.

On the other hand, mutant W397F gave no significant changes in the kinetic parameters of the enzyme with *p*NP-[GlcNAc]<sub>2</sub>. Its  $K_m$  and  $k_{\text{cat}}$  values were found to be 1.1 and 1.2 fold of that of the wild-type. These data suggested that Trp397 did not take part in the hydrolysis of this substrate.

### 3.5. TLC analysis of the hydrolytic activity of chitinase variants

The effects of the mutations on the hydrolytic activities against chitoooligomers (G2–G6) and colloidal chitin were further studied by thin layer chromatography (TLC). The cleavage patterns of each mutant were initially observed at a single point in time (60 min). As expected, none of the mutants hydrolyzed G2 substrate, as it only acts as the end product of the enzyme action [15]. With G3 substrate (Fig. 4A), W397F was the only mutant that degraded G3 to G1 and G2, while the wild-type and other mutants did not utilize G3 at all. Our recent study showed high  $K_m$  value (10.54 mM) of the native enzyme towards G3, indicating that G3 was a poor substrate for *V. carchariae* chitinase [15].

Distinct patterns of product formation became visible with longer-chain oligomers (G4–G6). With G4 substrate (Fig. 4B), the formation of G2 was seen at higher levels with mutants

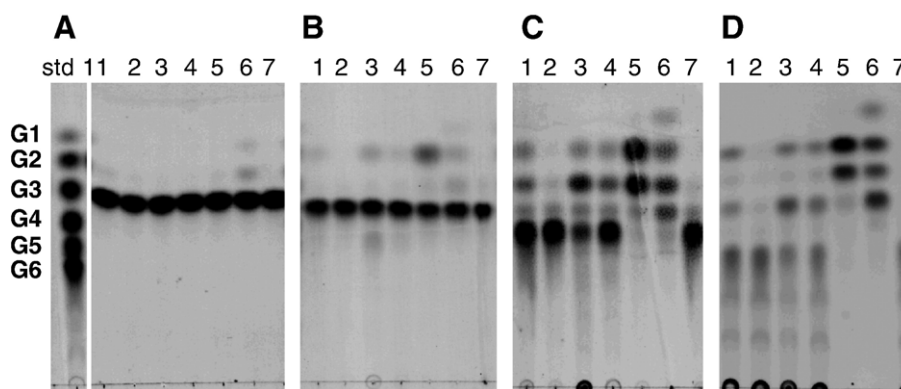


Fig. 4. TLC analysis of chitoooligosaccharide hydrolysis of chitinase A and mutants. A reaction mixture, containing 400 ng chitinase and 2.5 mM substrate (G2–G6) in 100 mM sodium acetate buffer, pH 5.0, was incubated for 60 min at 30 °C. After boiling, the reaction solution (5  $\mu\text{l}$ ) was analyzed on TLC and sugar products detected with aniline-diphenylamine reagent. (A) Hydrolysis of G3 substrate, (B) Hydrolysis of G4 substrate, (C) Hydrolysis of G5 substrate, and (D) Hydrolysis of G6 substrate. Lanes: std, standard mix of G1–G6; 1, wild-type; 2, D392N; 3, W168G; 4, Y171G; 5, W275G; 6, W397F; and 7, substrate control.

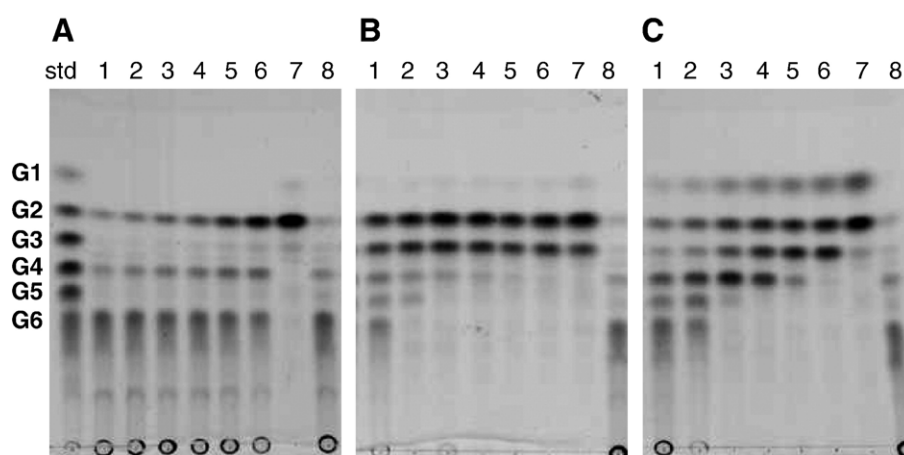


Fig. 5. Time-course of G6 hydrolysis by wild-type and mutants W275G and W397F. A reaction mixture (80  $\mu$ l), containing 800 ng wild-type (A), W275G (B), or W397F (C) and 2.5 mM G6 in 0.1 M sodium acetate buffer, pH 5.0, was incubated at various times at 30  $^{\circ}$ C, and then analyzed by TLC. Sugar products were detected with aniline-diphenylamine reagent. Lanes: std, a standard mix of G1–G6; 1–7, incubation at 2, 5, 10, 15, 30, 60 min and 18 h, respectively; and 8, substrate control.

Y171G, W275G, and W397F (with W275G having the most prominent signal). In G4 hydrolysis, an extra band corresponding to G5 was detected in the reaction with W168G, most likely due to be some transglycosylation occurring concurrently with hydrolysis. Enhanced glycosylation was also recently found by Aronson et al. [35] in point mutation of the non-reducing end residue (Trp167 to Ala) for *S. marcescens* chitinase A.

With G5 and G6 substrates (Fig. 4C and D), the aromatic side chain mutants in general created more hydrolytic products than the wild-type enzyme. The breakdown of these substrates to G2 and G3 was best achieved by W275G, whereas the release of G1–G4 intermediates was preferred by W397F. On the other hand, W168G and Y171G seemed to behave similarly to the wild-type homologue, by releasing a small amount of G4 and greater amounts of G3 and G2 in the reactions with G5 substrate, while releasing comparable amounts of G4 and G2 in the reactions with G6 substrate.

The discrimination in substrate hydrolysis between wild-type and its mutants W275G and W397 was confirmed by time

course experiments. Fig. 5A–C show the products formed by hydrolysis of G6 with the three variants at different times of reaction. Noticeably, both W275G and W397F hydrolyzed G6 much more efficiently than wild-type chitinase A. The reactions of W275G and W397F with G6 were already complete at 5 and 10 min, while substantial amounts of G6 were still present at these time points in the reaction mixture containing wild-type.

A further observation was that the three enzymes clearly adopted different modes of action on G6 substrate. This claim is supported by the fact that wild-type initially hydrolyzed G6 to G4 and G2. At the end of the reaction, G2 was produced as the major product (Fig. 5A). In contrast, W275G generated reaction intermediates of various lengths from G2 to G5 at initial times. Later, almost equal amounts of G2 and G3 were formed and this remained stable in course of reaction (Fig. 5B). On the other hand, W397F gave most distinct results by releasing a full range of G1–G5 products at early reaction times, eventually yielding G1 and G2 at the end (Fig. 5C).

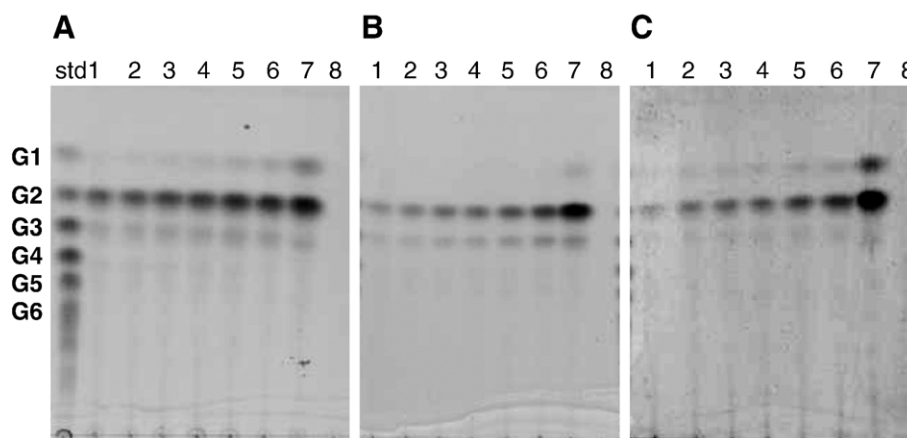


Fig. 6. Time-course of colloidal chitin hydrolysis by wild-type and mutants W275G and W397F. A reaction mixture (400  $\mu$ l), containing 80  $\mu$ g wild-type (A), W275G (B), or W397F (C) and 20 mg colloidal chitin in 0.1 M sodium acetate buffer, pH 5.0, was incubated at various times at 30  $^{\circ}$ C, and then analyzed by TLC using the same conditions as described for chitooligosaccharide hydrolysis. Lanes: std, standard mix of G1–G6; 1–7, incubation at 2, 5, 10, 15, 30, 60 min and 18 h, respectively; and 8, substrate control.

The difference in cleavage patterns was not visible when the three enzymes were used to hydrolyze colloidal chitin (Fig. 6A–C). Over the first 60 min of incubation, the three enzymes essentially degraded chitin to G2 as the major product, with trace amounts of G3. Then, after 18 h, G2 and G1 were produced as the major end products, with some G3 also being present in the reaction of the W275G mutant.

The 3D-structure of *S. marcescens* chitinase A E315L mutant complexed with hexaNAG revealed that the oligosaccharide occupied subsites –4 to +2. An almost superimposition of the substrate binding clefts of *Vibrio* and *Serratia* enzymes (Fig. 2B) led to the assumption that oligosaccharide substrates would occupy the binding cleft of the *Vibrio* chitinase A in a similar manner as it was observed with the *Serratia* enzyme. Further investigation of the products released from penta- and hexaNAG hydrolyses by *S. marcescens* wild-type chitinase A demonstrated that both substrates only occupied subsites –2 to +2 with additional sugars extend beyond the substrate-binding cleft at the reducing end [22]. Such a four subsite binding mode seemed to also be the case for *B. circulans* chitinase A1 [27]. Even though the binding mode of the *Vibrio* enzyme cannot be specified at this point in time, the shift in the degradation patterns against chitoooligomers upon particular point mutations gave indication that Trp275 and Trp397 are both important in the selective binding of soluble substrates.

A mutation of Trp397 to Phe results in an entire change in the cleavage patterns of the enzyme towards G6 and it can thus be assumed that Trp397 is involved in defining the primary binding sites for the incoming sugars so that the G2 and G4 will mainly be produced from the G6 substrate (Fig. 5A). Mutation of Trp397 to a less hydrophobic residue (Phe) seemed to loosen the binding affinity at this subsite. As a result, the incoming oligosaccharide had more freedom to assemble itself in the binding cleft, thus permitting various bonds to be exposed to the cleavage site (Fig. 5C). This finding is in a good agreement with the previous observations on *Serratia* and *Bacillus* chitinases [22,27]. Based on the –2 to +2 binding mode, Aronson et al. [22] suggested that the loss of binding affinity of the subsite +2 residue as a result of amino acid replacement (Trp396 to Ala) shifted the primary binding sites at least one position towards the non-reducing end.

Mutation of the +1 binding residue (Trp275) to Gly led to a major change in the hydrolysis of higher  $M_r$  oligosaccharides (as seen in Fig. 4B–D and Fig. 5B) by allowing the second and the third bonds of G6 from the non-reducing end (in the four subsite binding mode) to be equally accessed, confirming that Trp275 is involved in the specific binding of GlcNAc units around the cleavage site.

With colloidal chitin, no significant change in the cleavage patterns was seen as a result of the specific mutations of Trp275 and Trp397, which suggested that the two residues did not play the same role as in chitoooligosaccharide degradation. According to “the feeding-sliding theory” suggested by Watanabe’s group [23,27,34], a chitin polymer would enter the binding cleft unidirectionally from the non-reducing end rather than enter randomly like small substrates. Under these conditions, binding would be more influenced by a cluster of the surface-exposed

amino acid residues that stretch along the *N*-terminal chitin binding domain through the substrate binding cleft than by particular residues.

## Acknowledgements

This work was financially supported by Thailand Research Fund, The Thai Commission on Higher Education and the National Synchrotron Research Center (NSRC), Thailand. JS is a Senior Research Scholar of the Thailand Research Fund. CS was supported by a paid leave of absence from NSRC, Nakhon Ratchasima, Thailand. We would like to thank Dr. Chartchai Krittanai, Institute of Molecular Biology and Genetics, Mahidol University, Salaya, Nakhon Pathom, Thailand, for kindly providing the CD facility.

## References

- [1] C. Yu, A.M. Lee, B.L. Bassler, S. Roseman, Chitin utilization by marine bacteria. A physiological function for bacterial adhesion to immobilized carbohydrates, *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 24260–24267.
- [2] D.M. Rast, M. Horsch, R. Furter, G.W. Gooday, A complex chitinolytic system in exponentially growing mycelium of *Mucor rouxii*: properties and function, *J. Gen. Microbiol.* 137 (1991) 2797–2810.
- [3] H. Merzendorfer, L. Zimoch, Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases, *J. Exp. Biol.* 206 (2003) 4393–4412.
- [4] A. Herrera-Estrella, I. Chet, Chitinases in biological control, *EXS* 87 (1999) 171–184.
- [5] L.S. Melchers, M.H. Stuiver, Novel genes for disease-resistance breeding, *Curr. Opin. Plant Biol.* 3 (2000) 147–152.
- [6] R.S. Patil, V.V. Ghormade, M.V. Deshpande, Chitinolytic enzymes: an exploration, *Enzyme Microb. Technol.* 26 (2000) 473–483.
- [7] L.E. Donnelly, P.J. Barnes, Acidic mammalian chitinase—A potential target for asthma therapy, *TRENDS Pharmacol. Sci.* 25 (2004) 509–511.
- [8] M. Wills-Karp, C.L. Karp, Chitin checking—novel insights into asthma, *N. Engl. J. Med.* 351 (2004) 1455–1457.
- [9] W. Suginta, P.A. Robertson, B. Austin, S.C. Fry, L.A. Fothergill-Gilmore, Chitinases from *Vibrio*: activity screening and purification of chiA from *Vibrio carchariae*, *J. Appl. Microbiol.* 89 (2000) 76–84.
- [10] W. Suginta, A. Vongsuwan, C. Songsiriritthigul, H. Prinz, P. Estibeiro, R.R. Duncan, J. Svasti, L.A. Fothergill-Gilmore, An endochitinase A from *Vibrio carchariae*: cloning, expression, mass and sequence analyses, and chitin hydrolysis, *Arch. Biochem. Biophys.* 424 (2004) 171–180.
- [11] B. Henrissat, A. Bairoch, New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities, *Biochem. J.* 293 (1993) 781–788.
- [12] A. Perrakis, I. Tews, Z. Dauter, A.B. Oppenheim, I. Chet, K.S. Wilson, C.E. Vorgias, Crystal structure of a bacterial chitinase at 2.3 Å resolution, *Structure* 2 (1994) 1169–1180.
- [13] T. Hollis, A.F. Monzingo, K. Bortone, S. Ernst, R. Cox, J.D. Robertus, The X-ray structure of a chitinase from the pathogenic fungus *Coccidioides immitis*, *Protein Sci.* 9 (2000) 544–551.
- [14] K. Suzuki, M. Taiyoji, N. Sugawara, N. Nikaidou, B. Henrissat, T. Watanabe, The third chitinase gene (chiC) of *Serratia marcescens* 2170 and the relationship of its product to other bacterial chitinases, *Biochem. J.* 343 (1999) 587–596.
- [15] W. Suginta, A. Vongsuwan, C. Songsiriritthigul, J. Svasti, H. Prinz, Enzymatic properties of wild-type and active site mutants of chitinase A from *Vibrio carchariae*, as revealed by HPLC-MS, *FEBS J.* 272 (2005) 3376–3386.
- [16] I. Tews, A.C. Terwisscha van Scheltinga, A. Perrakis, K.S. Wilson, B.W. Dijkstra, Substrate-assisted catalysis unifies two families of chitinolytic enzymes, *J. Am. Chem. Soc.* 119 (1997) 7954–7959.

- [17] K.A. Brameld, W.A. Goddard III, Substrate distortion to a boat conformation at subsite –1 is critical in the mechanism of family 18 chitinases, *J. Am. Chem. Soc.* 120 (1998) 3571–3580.
- [18] A.C. Terwisscha van Scheltinga, S. Armand, K.H. Kalk, A. Isogai, B. Henrissat, B.W. Dijkstra, Stereochemistry of chitin hydrolysis by a plant chitinase/lysozyme and X-ray structure of a complex with allosamidin: evidence for substrate assisted catalysis, *Biochemistry* 34 (1995) 15619–15623.
- [19] D.M. van Aalten, D. Komander, B. Synstad, S. Gaseidnes, M.G. Peter, V.G. Eijssink, Structural insights into the catalytic mechanism of a family 18 exo-chitinase, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98 (2001) 8979–8984.
- [20] C. Sasaki, A. Yokoyama, Y. Itoh, M. Hashimoto, T. Watanabe, T. Fukamizo, Comparative study of the reaction mechanism of family 18 chitinases from plants and microbes, *J. Biochem. (Tokyo)* 131 (2002) 557–564.
- [21] T. Fukamizo, C. Sasaki, E. Schelp, K. Bortone, J.D. Robertus, Kinetic properties of chitinase-1 from the fungal pathogen *Coccidioides immitis*, *Biochemistry* 40 (2001) 2448–2454.
- [22] N.N. Aronson Jr., B.A. Halloran, M.F. Alexyev, L. Amable, J.D. Madura, L. Pasupulati, C. Worth, P. Van Roey, Family 18 chitinase-oligosaccharide substrate interaction: subsite preference and anomer selectivity of *Serratia marcescens* chitinase A, *Biochem. J.* 376 (2003) 87–95.
- [23] T. Watanabe, A. Ishibashi, Y. Ariga, M. Hashimoto, N. Nikaidou, J. Sugiyama, T. Matsumoto, T. Nonaka, Trp122 and Trp134 on the surface of the catalytic domain are essential for crystalline chitin hydrolysis by *Bacillus circulans* chitinase A1, *FEBS Lett.* 494 (2001) 74–78.
- [24] T. Uchiyama, F. Katouno, N. Nikaidou, T. Nonaka, J. Sugiyama, T. Watanabe, Roles of the exposed aromatic residues in crystalline chitin hydrolysis by chitinase A from *Serratia marcescens* 2170, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 41343–41349.
- [25] F. Katouno, M. Taguchi, K. Sakurai, T. Uchiyama, N. Nikaidou, T. Nonaka, J. Sugiyama, T. Watanabe, Importance of exposed aromatic residues in chitinase B from *Serratia marcescens* 2170 for crystalline chitin hydrolysis, *J. Biochem. (Tokyo)* 136 (2004) 163–168.
- [26] Y. Itoh, J. Watanabe, H. Fukada, R. Mizuno, Y. Kezuka, T. Nonaka, T. Watanabe, Importance of Trp59 and Trp60 in chitin-binding, hydrolytic, and antifungal activities of *Streptomyces griseus* chitinase C, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72 (2006) 1176–1184.
- [27] T. Watanabe, Y. Ariga, U. Sato, T. Toratani, M. Hashimoto, N. Nikaidou, Y. Kezuka, T. Nonaka, J. Sugiyama, Aromatic residues within the substrate-binding cleft of *Bacillus circulans* chitinase A1 are essential for hydrolysis of crystalline chitin, *Biochem. J.* 376 (2003) 237–244.
- [28] Collaborative Computational Project, Number 4, The CCP4 suite: programs for protein crystallography, *Acta Cryst. D50* (1994) 760–763.
- [29] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227 (1970) 680–685.
- [30] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254.
- [31] A. Bruce, U. Srinivasan, H.J. Staines, T.L. Highley, Chitinase and laminarinase production in liquid culture by *Trichoderma* spp. and their role in biocontrol of wood decay fungi, *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 35 (1995) 337–353.
- [32] S.C. Hsu, J.L. Lockwood, Powdered chitin agar as a selective medium for enumeration of actinomycetes in water and soil, *Appl. Microbiol.* 29 (1975) 422–426.
- [33] T. Tanaka, S. Fujiwara, S. Nishikori, T. Fukui, M. Takagi, T. Imanaka, A unique chitinase with dual active sites and triple substrate binding sites from the hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus kodakaraensis* KOD1, *Appl. Environ. Microbiol.* 15 (1999) 5338–5344.
- [34] T. Imai, T. Watanabe, T. Yui, J. Sugiyama, Directional degradation of beta-chitin by chitinase A1 revealed by a novel reducing end labelling technique, *FEBS Lett.* 510 (2002) 201–205.
- [35] N.N. Aronson Jr., B.A. Halloran, M.F. Alexeyev, X.E. Zhou, Y. Wang, E.J. Meehan, L. Chen, Mutation of a conserved tryptophan in the chitin-binding cleft of *Serratia marcescens* chitinase A enhances transglycosylation, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 70 (2006) 243–251.



## The effects of the surface-exposed residues on the binding and hydrolytic activities of *Vibrio carchariae* chitinase A

Supansa Pantoom<sup>1</sup>, Chomphunuch Songsiriritthigul<sup>2</sup> and Wipa Suginta<sup>\*1</sup>

Address: <sup>1</sup>School of Biochemistry, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima 30000, Thailand and <sup>2</sup>National Synchrotron Research Center, Nakhon Ratchasima 30000, Thailand

Email: Supansa Pantoom - aon\_biochem@hotmail.com; Chomphunuch Songsiriritthigul - pook@nsrc.or.th; Wipa Suginta\* - wipa@sut.ac.th

\* Corresponding author

Published: 21 January 2008

Received: 17 September 2007

BMC Biochemistry 2008, 9:2 doi:10.1186/1471-2091-9-2

Accepted: 21 January 2008

This article is available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2091/9/2>

© 2008 Pantoom et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

### Abstract

**Background:** *Vibrio carchariae* chitinase A (EC3.2.1.14) is a family-18 glycosyl hydrolase and comprises three distinct structural domains: i) the amino terminal chitin binding domain (ChBD); ii) the  $(\alpha/\beta)_8$  TIM barrel catalytic domain (CatD); and iii) the  $\alpha + \beta$  insertion domain. The predicted tertiary structure of *V. carchariae* chitinase A has located the residues Ser33 & Trp70 at the end of ChBD and Trp231 & Tyr245 at the exterior of the catalytic cleft. These residues are surface-exposed and presumably play an important role in chitin hydrolysis.

**Results:** Point mutations of the target residues of *V. carchariae* chitinase A were generated by site-directed mutagenesis. With respect to their binding activity towards crystalline  $\alpha$ -chitin and colloidal chitin, chitin binding assays demonstrated a considerable decrease for mutants W70A and Y245W, and a notable increase for S33W and W231A. When the specific hydrolyzing activity was determined, mutant W231A displayed reduced hydrolytic activity, whilst Y245W showed enhanced activity. This suggested that an alteration in the hydrolytic activity was not correlated with a change in the ability of the enzyme to bind to chitin polymer. A mutation of Trp70 to Ala caused the most severe loss in both the binding and hydrolytic activities, which suggested that it is essential for crystalline chitin binding and hydrolysis. Mutations varied neither the specific hydrolyzing activity against pNP-[GlcNAc]<sub>2</sub>, nor the catalytic efficiency against chitohexaose, implying that the mutated residues are not important in oligosaccharide hydrolysis.

**Conclusion:** Our data provide direct evidence that the binding as well as hydrolytic activities of *V. carchariae* chitinase A to insoluble chitin are greatly influenced by Trp70 and less influenced by Ser33. Though Trp231 and Tyr245 are involved in chitin hydrolysis, they do not play a major role in the binding process of crystalline chitin and the guidance of the chitin chain into the substrate binding cleft of the enzyme.

### Background

Chitin is a homopolysaccharide chain of *N*-acetylglucosamine (GlcNAc or G1) units combined together with  $\beta$ -1,4 glycosidic linkages. Chitin is one of the most abundant biopolymers found in nature as constituent of fungal

cell walls and exoskeletons of crustaceans and insects. However, the  $\beta$ -GlcNAc units that generally form intra- and intermolecular H-bonds make chitin completely insoluble in water and its use is thus limited. Several strategies have been developed for converting chitin into small

soluble derivatives, which are more useful for applications in the fields of medicine, agriculture and industry. Enzymatic degradation of chitin using biocatalysts seems to be the method of choice since the type, quantity and quality of oligomeric products can be well controlled and the reaction occurs quickly and completely under mild conditions without generation of environmental pollutants.

Chitinases (EC3.2.1.14) are a diverse group of enzymes that catalyze the conversion of insoluble chitin to soluble oligosaccharides. They are found in a wide variety of organisms including virus, bacteria, fungi, insects, plants and animals [1-8]. In the carbohydrate active enzymes (CAZy) database <http://www.cazy.org/>, carbohydrate enzymes are first classified as glycosyl hydrolases (GH), glycosyl transferases (GT), polysaccharide lyases (PL), carbohydrate esterases (CE), and carbohydrate binding modules (CBM), and then further divided into numbered families with structurally-related catalytic and carbohydrate-binding modules. Following this classification, chitinases are commonly listed as family GH-18 and family GH-19 enzymes. Family-18 chitinases have the catalytic crevice located at top of the  $(\alpha/\beta)_8$ -TIM barrel domain [9,10], whereas the catalytic domain of family-19 chitinases comprises two lobes, each of which is rich in  $\alpha$ -helical structure [11]. Bacteria such as *Serratia marcescens*, *Bacillus circulans*, *Alteromonas* sp. and marine *Vibrios* produce chitinases to synergistically degrade chitin and use it as a sole source of energy [1,12-16]. The mechanism of chitin degradation by bacterial chitinases was mainly derived from the outcome of structural studies or site-directed mutagenesis [17-20]. Unlike chitooligosaccharides, chitin polymer has been presumed to unidirectionally enter the substrate binding cleft of chitinases under the guidance of a few surface-exposed residues at the exterior of the substrate binding cleft [21,22]. Those residues were identified as Trp33, Trp69, Phe232, and Trp245 in *S. marcescens* Chi A [18], Ser33, Trp70, Trp232, and Trp245 in *Aeromonas caviae* Chi1 [23], and Trp122 and Trp134 in *B. circulans* Chi A1 [17]. Structurally, the latter two residues are located in the equivalent locations of Tyr245 and Trp231, respectively of *V. carchariae* chitinase A (Fig. 1 and ref [17]). We previously isolated chitinase A from a marine bacterium, *Vibrio carchariae* [24]. The enzyme was found to be highly expressed upon induction with chitin and was active as a monomer of 63 kDa. The DNA fragment encoding the functional chitinase A was subsequently cloned into the pQE60 expression vector that was compatible to be highly expressed in *E. coli* type strain M15 [25]. Mutational studies confirmed that the conserved Glu315 acts as the catalytic residue in the substrate-assisted mechanism [26,27], whereas the aromatic residues including Trp168, Tyr171, Trp275, Trp397 and Trp570 participated in direct interactions with chitooligosaccharides [28]. In this study, site-directed mutagenesis

was employed in combination with following chitin binding assays and kinetic analysis to investigate the significance of the putative surface-exposed residues Ser33, Trp70, Trp231 and Tyr245 for the binding and hydrolytic activities of the *Vibrio* chitinase A.

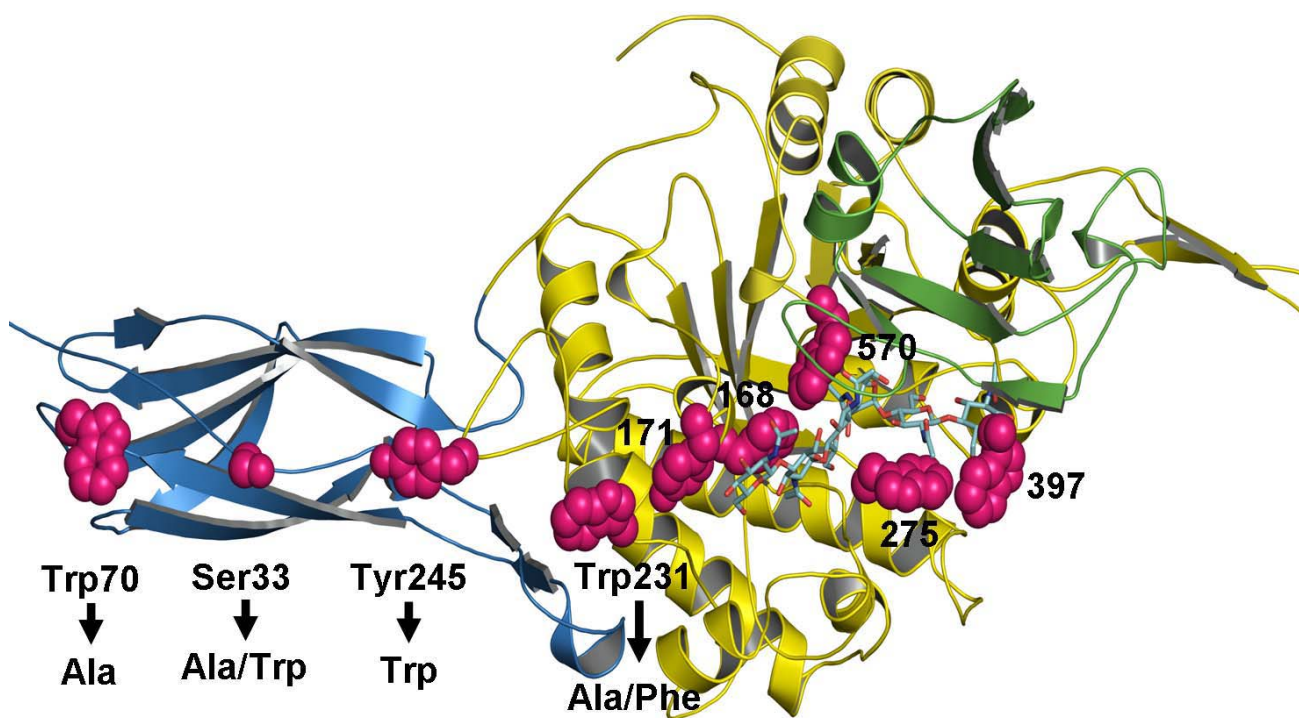
## Results

### Homology modeling and sequence analysis

We previously reported gene isolation and sequence analysis of *V. carchariae* chitinase A precursor [25]. Site-directed mutation of the active site residues showed that Glu315 plays an essential role in catalysis [26]. On the other hand, the conserved aromatic residues (Trp168, Tyr171, Trp275, Trp397 and Trp570) located within the substrate binding cleft of the enzyme were found to be important in binding to chitooligosaccharides [28]. Here, we have investigated the functional roles of four amino acid residues (Ser33, Trp70, Trp231 and Tyr245) at the surface of *V. carchariae* chitinase A. All of these residues have been proposed as functionally relevant to binding and hydrolysis of crystalline chitin [17,18]. Fig. 1 represents the modeled 3D-structure of *V. carchariae* chitinase A that was built based upon the crystal structure of *S. marcescens* chitinase A mutant E315L complexed with a chitohexamer [see Methods]. It can clearly be seen that the four residues linearly align with each other. Trp70 and Ser33 are positioned at the end of the N-terminal chitin binding domain (ChBD), whilst Trp231 and Tyr245 are found outside the substrate binding cleft where they are part of the TIM barrel catalytic domain.

When the amino acid sequences of several bacterial chitinases were compared, the *V. carchariae* chitinase A (Q9AMP1) exhibited highest sequence identity with chitinase A from *V. harveyi* HY01 (A6AUU6) (93%), moderate identity with chitinase A from *S. marcescens* (P07254) and *Enteromonas* sp. (Q4PZF3) (47%), and low identity with chitinase A1 from *B. circulans* (22%). Surprisingly, extremely low sequence identity was observed when *V. carchariae* chitinase A was compared with chitinase A from *V. splendidus* (A3UMC6) (13%) and *V. cholerae* (A6ACY6) (11%).

A structure-based alignment of three chitinases, including *V. carchariae* chitinase A, *S. marcescens* chitinase A, and *B. circulans* WL-12 chitinase A1 was constructed and is displayed in Fig. 2A & 2B. Fig. 2A represents an alignment of the N-terminal ChBDs of the *Vibrio* and *Serratia* chitinases with the C-terminal fragment that covers the ChBD of the *Bacillus* chitinase A1 (ChBD<sub>ChiA1</sub>). The ChBD<sub>ChiA1</sub> consists of the residues 655 to 699 and deletion of this domain led to a severe loss in the binding activity to chitin as well as in the colloidal chitin-hydrolyzing activity, suggesting that this domain is essential for binding to insoluble chitin of this enzyme [29]. As shown in Fig. 2A, the residues

**Figure 1**

**The Swiss-Model 3D-structure of *V. carchariae* chitinase A.** A ribbon representation of the 3D-structure of *V. carchariae* chitinase A was constructed based on the x-ray structure of *S. marcescens* Chi A E315L mutant as described in the text. The N-terminal chitin binding domain is presented in cyan, the TIM barrel domain in yellow and the small insertion domain in green. The coordinates of [GlcNAc]<sub>6</sub> that are modeled in the active site of the *Vibrio* enzyme are shown as a stick model with N atoms in blue and O atoms in red. The mutated residues (Ser33, Trp70, Trp231 and Tyr245) and other substrate binding residues are also presented in stick model (magenta).

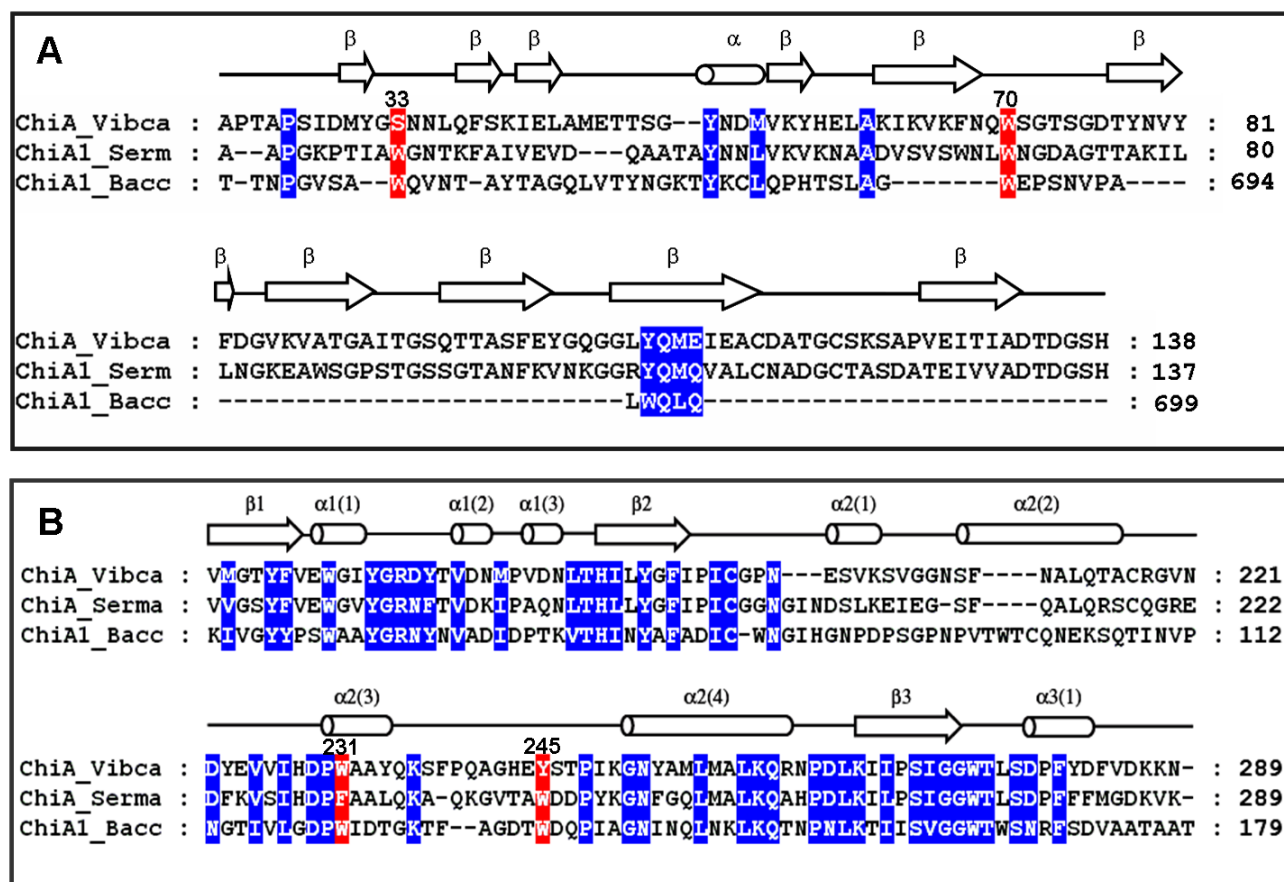
Trp656 and Trp687 of the ChBD<sub>chiA1</sub> are well aligned with Ser33 and Trp70 of *V. carchariae* chitinase A. However, the determination of the solution structure of the ChBD<sub>chiA1</sub> by Ikegami et al. [30] identified only Trp687 as a putative chitin binding residue, in addition to His681, Thr682, Pro689, and Pro693.

With respect to the alignment of the catalytic domain (Fig. 2B), Trp231 of the *Vibrio* chitinase is equivalent to Trp122 and to Phe232 of the *Bacillus* and *Serratia* chitinases. For Tyr245, this residue is replaced by Trp134 and Trp245 in the *B. circulans* and *S. marcescens* sequences, respectively. The sequence alignment additionally demonstrates the residues Ser33 and Trp70 within the flexible loops that join two strands in the chitin binding region. The residues Trp245 and Tyr231 are found as part of the catalytic ( $\alpha/\beta$ )<sub>8</sub> TIM barrel, where Tyr245 is exposed on the loop that

joins helices 2(3) and 2(4) together and Trp231 is the only residue being found in an  $\alpha$ -helix (helix 2(3)).

#### **Expression and purification of chitinase A and mutants**

To investigate the binding and hydrolytic activities of *V. carchariae* chitinase A, target residues as named above were mutated by site-directed mutagenesis. According to the employed system, the recombinant chitinases were expressed as the C-terminally (His)<sub>6</sub> tagged fusion protein (see Methods). After single-step purification using Ni-NTA agarose affinity chromatography, the yields of the purified proteins was estimated to be approx. 20 to 25 mg/ml per litre of bacterial culture. As analyzed by SDS-PAGE, all the mutated proteins displayed a single band of molecular weight of 63 kDa (data not shown), which is identical to the molecular weight of the wild-type enzyme.

**Figure 2**

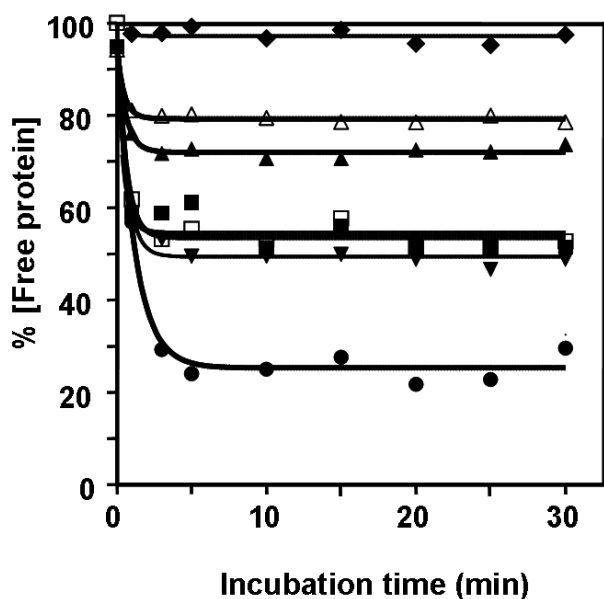
**A structure-based alignment of *V. carchariae* chitinase A with *S. marcescens* chitinase A and *B. circulans* chitinase A1.** A) The N-terminal ChBDs of *V. carchariae* chitinase A (residues 22–138) and *S. marcescens* chitinase A (residues 24–137) were aligned with the C-terminal fragment (residues 648–699), covering the ChBD of *B. circulans* WL-12 chitinase A1. B) An alignment of the catalytic domain of the three bacterial chitinases with residues 160 to 289 of *V. carchariae* chitinase A being displayed. The chitinase sequences were retrieved from the Swiss-Prot/TreEMBL protein databases, aligned using "MegAlign" in the DNASTAR package, and displayed in Genedoc. The secondary structure of *V. carchariae* chitinase A was predicted from the PHD method in PredictProtein using *S. marcescens* as template [see texts]. Conserved residues are shaded in blue, whereas the residues that are aligned with Ser33, Trp70, Trp231, and Tyr245 of *V. carchariae* chitinase A are shaded in red. ChiA\_Vibca: *V. carchariae* chitinase A (Q9AMP1), ChiA\_Serma: *S. marcescens* chitinase A (P07254), and ChiA1\_Bacc: *B. circulans* chitinase A1 (P20533).  $\beta$ -strand is represented by an arrow,  $\alpha$ -helix by a cylinder and loop by a straight line.

### Effects of mutations on the chitin binding activities of chitinase A

To minimize hydrolysis, all the binding experiments were carried out on ice. Bindings of the wild-type chitinase and mutants to colloidal chitin were initially investigated as a function of time. After a removal of the enzyme bound to chitin, decreases in concentration of the unbound enzyme remaining in the supernatant was monitored discretely at different time points of 0 to 120 min. Fig. 3 demonstrates that the binding process took place rapidly and reached equilibrium within 5 min. The relative binding activity of each mutant to colloidal chitin is following the order W231A > S33W > WT  $\cong$  W231F > S33A > Y245W > W70A.

The binding activity of the individual mutants relative to the one of the wild-type enzyme was further examined with colloidal chitin and  $\alpha$ -chitin polysaccharides at a single time point of 60 minutes. In general, the wild-type and mutant chitinases expressed greater binding activity towards colloidal chitin. A comparison of the level of binding of the engineered enzymes to the two substrates revealed a similar pattern (Fig. 4). For both polysaccharides, W70A and Y245W displayed lower binding activity than the wild-type enzyme. S33A and W231F showed a modest increase in binding to crystalline  $\alpha$ -chitin and decreased level of binding to colloidal chitin. Mutants S33W and W231A, on the other hand, displayed higher





**Figure 3**  
**Time-course of binding of chitinase A and mutant enzymes to colloidal chitin.** Chitinases (1  $\mu\text{mol}$  in 100 mM sodium acetate buffer, pH 5.5) were incubated with 1.0 mg colloidal chitin at 0°C. Decreases in free enzyme concentration were determined at different time points from 0–30 min by Bradford's method. Each data value was calculated from triplicate experiments. Symbols: wild-type (black square); S33A (black upward-pointing triangle); S33W (black downward-pointing triangle); W70A (black diamond); W231A (black circle); W231F (open square); and Y245W (open triangle).

effectiveness in the binding to both substrates. Of all, mutant W231A displayed highest binding activity and W70A exhibited lowest activity. Especially, no detectable binding to crystalline  $\alpha$ -chitin was observed with mutant W70A.

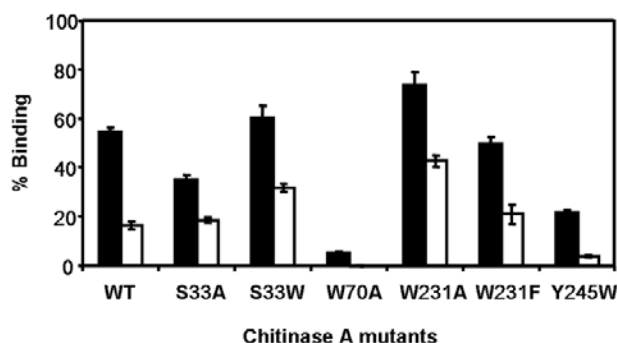
Adsorption isotherms of chitinase mutants to colloidal chitin were carried out relative to that of the wild-type enzyme. Fig. 5 represents a non linear plot of the adsorption isotherms obtained at a fixed concentration of colloidal chitin but varied concentrations of the enzyme (See Methods). In comparison to the wild-type enzyme, mutants S33W and W231A exhibited significantly higher binding activity, whereas mutants W70A, S33A, W231F and Y245W had a notably decreased binding activity. When the dissociation binding constants ( $K_d$ ) were estimated from the non-linear regression function, it was found that the  $K_d$  value of wild-type ( $0.95 \pm 0.11 \mu\text{M}$ ) was slightly larger than the  $K_d$  values of S33W ( $0.84 \pm 0.09 \mu\text{M}$ ) and W231F ( $0.88 \pm 0.09 \mu\text{M}$ ), but remarkably greater than the value of W231A ( $0.26 \pm 0.03 \mu\text{M}$ ). In contrast,

significantly higher  $K_d$  values than the wild-type value were observed with S33A ( $1.50 \pm 0.11 \mu\text{M}$ ), W70A ( $2.30 \pm 0.25 \mu\text{M}$ ), and Y245W ( $1.60 \pm 0.16 \mu\text{M}$ ). These estimated  $K_d$  values gave a notation of the enzyme's binding strength in the following order W231A > S33W > W231F > wild-type > S33A > Y245W > W70A, which is in absolute accordance with the binding activities determined by the chitin binding assay (see Fig. 4) and the kinetic data as described below.

#### Effects of mutations on the hydrolytic activities of chitinase A

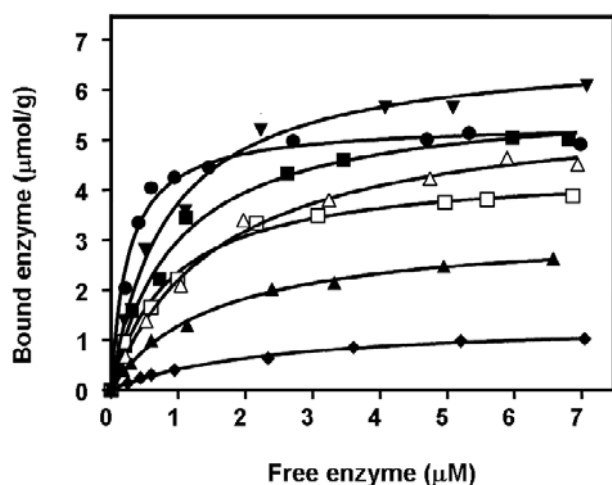
The effects of mutations on the hydrolytic activity of *V. carchariae* chitinase A were further studied by exposing the wild-type and modified enzymes to pNP-[GlcNAc]<sub>2</sub>, colloidal chitin and crystalline  $\alpha$ -chitin. The specific hydrolyzing activity for the three different substrates was subsequently determined. From all the mutants, only W231A displayed a slightly reduced specific hydrolyzing activity against the pNP substrate (Table 1).

Unlike the pNP-glycoside, strong effects on the hydrolytic activities were observed with the insoluble polymeric substrates. The hydrolyzing activity against crystalline  $\alpha$ -chitin was completely abolished in case of mutants S33A, W70A and W231A/F but improved for mutants S33W and Y245W at levels of 166% and 250% of the wild-type activity, respectively. A similar trend was also seen with colloi-



**Figure 4**  
**Binding of chitinase A and mutants to insoluble chitin.** The binding assay set as described in the text was incubated with crystalline  $\alpha$ -chitin or colloidal chitin for 60 min.

The % binding =  $\left[ \frac{E_t - E_f}{E_t} \right] \times 100$ ; where  $E_t$  is initial enzyme concentration and  $E_f$  is the free enzyme concentration after binding. Closed and open bars represent % binding to colloidal chitin and crystalline  $\alpha$ -chitin, respectively. The presented data are mean values obtained from three independent sets of the experiment.



**Figure 5**  
**Equilibrium adsorption isotherms of wild-type and mutant chitinases A to colloidal chitin.** The reaction assay (500  $\mu$ l) contained 1.0 mg chitin and varied concentrations of enzyme from 0 to 7.0  $\mu$ M. After 60 min of incubation at 0°C, the reaction mixture was centrifuged and concentrations of  $E_b$  and  $E_f$  were determined as described in the text. Symbols: wild-type (black square); S33A (black upward-pointing triangle); S33W (black downward-pointing triangle); W70A (black diamond); W231A (black circle); W231F (open square); and Y245W (open triangle).

dal chitin. However, for this substrate S33A, W70A and W231A/F not completely abolished but markedly decreased hydrolyzing activity, while S33W (119%) and Y245W (152%) again where the ones that displayed higher activity than wild-type enzyme. The most severe loss of the specific hydrolyzing activity towards colloidal chitin was detected for mutant W70A, which had a substitution of Trp70 to Ala.

#### Steady-state kinetics of chitinase A and mutants

The kinetic parameters of the hydrolytic activity of chitinase A and mutants were finally determined with chito-hexaose and colloidal chitin as substrates. As presented in Table 2, mutations of the chosen residues led for the response of enzyme values towards the hexachitooligomer to concomitant decreases in both the  $K_m$  and  $k_{cat}$  values. For all the mutants, however, the overall catalytic efficiency ( $k_{cat}/K_m$ ) was not much different to the value observed for the wild-type enzyme. In contrast, the kinetic properties of the enzyme against colloidal chitin were significantly modified by the mutations. The  $K_m$  values of S33A ( $2.07 \cdot 10^1$  mg ml<sup>-1</sup>), W70A ( $2.26 \cdot 10^1$  mg ml<sup>-1</sup>), and Y245W ( $1.82 \cdot 10^1$  mg ml<sup>-1</sup>) were higher than the wild-type  $K_m$  ( $1.74 \cdot 10^1$  mg ml<sup>-1</sup>) whereas S33W ( $1.58 \cdot 10^1$  mg ml<sup>-1</sup>) and W231A ( $1.01 \cdot 10^1$  mg ml<sup>-1</sup>) had considerably lower  $K_m$  compared to the reference value. Mutations that caused a large decrease in the enzyme's catalytic activity,  $k_{cat}$ , were Ser33 to Ala, Trp70 to Ala and Trp231 to Ala/Phe, whereas mutations of Ser33 to Trp and Tyr245 to Trp elevated  $k_{cat}$  values instead. The overall catalytic efficiency ( $k_{cat}/K_m$ ) that was calculated for the hydrolysis of colloidal chitin was to more or less extent either reduced (for S33A, W70A, W231A and W231F) or increased (for S33W and Y245W).

#### Discussion

This study describes the possible role of Ser33, Trp70, Trp231, and Tyr245 in chitin binding and hydrolysis. Point mutations of these residues were introduced by site-directed mutagenesis and changes in the binding and hydrolytic activities of the enzyme as a result of the amino acid substitution were subsequently investigated for various substrates. Chitin binding assays (Fig. 3 & 4) demonstrate a decrease in the binding activity of mutants S33A, W70A and Y245W to various extents. However, the most severe effect was observed with W70A. A time course study displayed no binding activity of W70A but retained activ-

**Table 1: Specific hydrolyzing activity of chitinase A and mutants. The reducing sugar assay was carried out against crystalline and colloidal chitin. The release of the hydrolytic products was calculated from a standard curve of [GlcNAc]<sub>2</sub>. On the other hand, the specific hydrolyzing activity against pNP-[GlcNAc]<sub>2</sub> was determined by the colorimetric assay. The release of pNP was estimated from a standard curve of pNP**

Protein	Specific hydrolyzing activity (U/ $\mu$ mol protein) <sup>a</sup>		
	Crystalline chitin	Colloidal chitin	pNP-[GlcNAc] <sub>2</sub>
Wild-type	0.59 $\pm$ 0.02 (100) <sup>b</sup>	12.9 $\pm$ 0.22 (100)	50.5 $\pm$ 1.13 (100)
S33A	n.d. <sup>c</sup>	8.5 $\pm$ 0.50 (66)	58.0 $\pm$ 1.08 (115)
S33W	1.00 $\pm$ 0.08 (166)	15.3 $\pm$ 0.32 (119)	54.0 $\pm$ 2.55 (107)
W70A	n.d.	4.3 $\pm$ 0.17 (33)	52.8 $\pm$ 2.14 (105)
W231A	n.d.	6.6 $\pm$ 0.26 (51)	45.2 $\pm$ 2.00 (90)
W231F	n.d.	9.2 $\pm$ 0.49 (71)	54.3 $\pm$ 2.85 (108)
Y245W	1.49 $\pm$ 0.09 (250)	19.6 $\pm$ 0.53 (152)	53.6 $\pm$ 1.61 (106)

<sup>a</sup> One unit of chitinase is defined as the amount of enzyme that releases 1  $\mu$ mol of [GlcNAc]<sub>2</sub> or 1 nmol of pNP per min at 37°C.

<sup>b</sup> Values in parentheses represent relative specific hydrolyzing activities (%).

<sup>c</sup> Non-detectable activity.

**Table 2: Kinetic parameters of substrate hydrolysis by chitinase A wild-type and mutants. A kinetic study was carried out using 0–5% (w/v) colloidal chitin and 0–500  $\mu$ M chitohexaose as substrates. After 10 minutes of incubation at 37°C, the amounts of the reaction products were determined from a standard curve of [GlcNAc]<sub>2</sub>**

Chitinase A variant	Chitohexaose			Colloidal chitin		
	$K_m(\mu\text{M})$	$k_{\text{cat}}(\text{s}^{-1})$	$k_{\text{cat}}/K_m(\text{s}^{-1}\text{M}^{-1})$	$K_m(10^1 \text{ mg ml}^{-1})$	$k_{\text{cat}}(\text{s}^{-1})$	$k_{\text{cat}}/K_m(10^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ mg ml}^{-1})$
Wild-type	218 $\pm$ 22.0	2.9	$1.3 \times 10^3$ (100) <sup>a</sup>	1.74 $\pm$ 0.1	1.2	0.7 (100)
S33A	171 $\pm$ 20.5	2.6	$1.5 \times 10^3$ (115)	2.07 $\pm$ 0.2	0.9	0.4 (57)
S33W	210 $\pm$ 15.4	2.8	$1.3 \times 10^3$ (100)	1.58 $\pm$ 0.2	1.4	0.9 (129)
W70A	185 $\pm$ 22.0	2.5	$1.3 \times 10^3$ (100)	2.26 $\pm$ 0.4	0.4	0.2 (29)
W231A	189 $\pm$ 13.2	2.6	$1.4 \times 10^3$ (108)	1.01 $\pm$ 0.2	0.6	0.6 (86)
W231F	163 $\pm$ 10.3	2.4	$1.5 \times 10^3$ (115)	1.70 $\pm$ 0.2	0.9	0.5 (71)
Y245W	201 $\pm$ 13.1	2.6	$1.3 \times 10^3$ (100)	1.82 $\pm$ 0.2	1.7	0.9 (129)

<sup>a</sup> Relative catalytic efficiencies (%) are shown in parentheses.

ity of other mutants to colloidal chitin (Fig. 3). This strongly suggested that Trp70 is the major determinant for insoluble chitin binding. Sugiyama and colleagues previously employed the reducing-end labeling technique and the tilt micro-diffraction method [21,22] to illustrate the molecular directionality of crystalline  $\beta$ -chitin hydrolysis by *S. marcescens* chitinase A and *B. chitinase* chitinase A1. If the chitin polymer enters the substrate binding cleft of *V. carchariae* chitinase A from the reducing end as described for the *Serratia* and *Bacillus* enzymes, Trp70 will likely serve as a platform for the arrival of a chitin molecule. This idea is well complimented by the location of the residue at the end of ChBD. A remarkable loss of the specific hydrolyzing activity as well as the decrease in the rate of enzyme turnover ( $k_{\text{cat}}$ ) that was observed for mutant W70A is hence explainable by the loss of the binding strength due to a substitution of Trp to Ala and an associated change in the hydrophobic interactions. A similar performance was seen for residue Ser33. Although to a lesser extent, a mutation of Ser33 to Ala also led to decreased binding activity, while its mutation to Trp improved binding activity. This finding provides additional evidence that binding of the chitin chain to the ChBD is cooperatively taken place via hydrophobic interactions and influenced by the molecular setting in this region.

The most striking observations were made with the residue Trp231. As demonstrated by the modeled 3D-structure (see Fig. 1), the residue Trp231 is placed at the outermost of the catalytic surface, thereby lying closest to the non-reducing end of the substrate binding cleft. The observed drastic improvement (rather than reduction) in the binding efficiency of mutant W231A could only be explained as a removal of the side-chain blockage. Hence, the reduced hydrolyzing activity of mutant W231A was unlikely influenced by changes in the binding activity as

a result of the alanine substitution of Trp231. Apparently, the same phenomenon was previously recognized in *S. marcescens* chitinase A [18], with which a mutation of Phe232 to Ala seriously diminished the hydrolyzing activity but left the binding activities to both colloidal chitin and  $\beta$ -chitin microfibrils unchanged.

When the next residue in line (Tyr245) (see Fig. 1) was mutated to a bulkier side-chain (Trp), inverse effects (reduced binding but improved hydrolysis) were observed. This complimented the idea of the binding barrier around the entrance hall of the catalytic domain by Trp231 and Tyr245. Similar findings were also recognized with a cellulose degrading enzyme, *Thermobifida fusca* endoglucanase (Cel9A) [31]. With this enzyme, it was observed that mutations of the surface-exposed cellulose binding residues Arg557 and Glu559 to Ala (mutant R557A/E559A) led to a severe loss in the hydrolytic activity against crystalline cellulose, but a change in the binding activity was not at all observed. Structurally, the residues Arg557 and Glu559 are found on the surface of the cellulose binding module (CBM), closest to the catalytic binding cleft of Cel9A. Therefore, the effects of Arg557 and Glu559 would be explained in analogy to those of Trp231 and Tyr245 in *V. carchariae* chitinase A.

In marked contrast, observations made with the *Vibrio* Trp231 mutation were different to the studies of Li et al. on *A. caviae* Chi 1 [23] and of Watanabe et al. on *B. circulans* Chi A1 [17]. Mutations of Trp232 and Trp245 (in *A. caviae* Chi 1) or Trp122 and Trp 134 (in *B. circulans*) to alanine resulted in a marked loss in both binding and hydrolyzing activities, especially against crystalline  $\beta$ -chitin. Therefore, the reduced hydrolytic activities were assumed to be associated with the weaker binding of the two corresponding residues. Based on their mutational data, the residues seemed to participate directly in binding

to crystalline chitin, and subsequently cooperatively assisting the chitin chain to penetrate through the catalytic cleft of *A. caviae* or *B. circulans* chitinase.

Indeed, the above-mentioned event that took place in the *A. carviae* and *B. circulans* chitinases did not seem to be the case for the *V. carchariae* chitinase A due to different behaviors of Trp231 and Tyr245 found for the *Vibrio* enzyme. Our data suggested that a possible action of *V. carchariae* chitinase A on insoluble chitin could proceed as follows: i) Initial binding of a chitin chain to the ChBD. This process is most influenced by the hydrophobic interaction set between the incoming sugar and residue Trp70, which is located at the doorway of the ChBD; ii) Further binding of GlcNAc units. However, binding through Ser33 remains inconclusive, since the mutational results revealed that Ser33 did not act as a powerful binding residue. Alternatively, this binding step might be made through a different surface-exposed aromatic residue located nearby; and iii) Sliding of bound sugar units of the chitin chain into the substrate binding cleft. Based on the 'slide and bend' mechanism proposed by Watanabe and others [17,21,32], the sliding process is achieved by cooperative interactions with other surface-exposed aromatic residues located close to the entrance of the substrate binding cleft. However, our data strongly suggested that the chitin chain movement most likely takes place via an interaction with different surface-exposed aromatic residues other than Tyr245 and Trp231.

When *p*NP-[GlcNAc]<sub>2</sub> was used as a substrate, hydrolyzing activities of the mutated enzymes and the wild-type enzyme were almost indistinguishable. This observation and the essentially unchanged catalytic efficiency ( $k_{cat}/K_m$ ) of all mutants compared to wild-type enzyme clearly pointed out that Ser33, Trp70, Trp231 and Tyr245 do not play a major role in the process of hydrolysis of soluble chitooligosaccharides.

## Conclusion

Point mutations of four surface-exposed residues of *V. carchariae* chitinase A and subsequent experiments on chitin binding and hydrolysis were performed. Trp70, which is located at the N-terminal end of the chitin binding domain, was identified as the most crucial residue in colloidal and crystalline chitin binding and consequently their hydrolysis. The residues Trp231 and Tyr245, both located nearer to the substrate-binding cleft, influenced chitin hydrolysis but not really insoluble chitin binding.

## Methods

### Bacterial strains and expression plasmid

*Escherichia coli* type strain DH5 $\alpha$  was used for routine cloning, subcloning and plasmid preparation. Supercompetent *E. coli* XL1Blue (Stratagene, La Jolla, CA, USA) was

the host strain for the production of mutagenized DNA. *E. coli* type strain M15 (Qiagen, Valencia, CA, USA) and the pQE 60 expression vector harboring *chitinase A* gene fragments were used for a high-level expression of recombinant chitinases.

### A structural based sequence alignment and homology modeling

The amino acid sequence alignment was constructed by the program MegAlign using CLUSTAL method algorithm in the DNASTAR package (Biocompare, Inc., CA, USA) and displayed in Genedoc [33]. The amino acid sequence of the *V. carchariae* chitinase was aligned with five selected bacterial chitinase sequences available in the Swiss-Prot or TrEMBL database (see Results). The secondary structure elements of *V. carchariae* chitinase A were obtained by the PHD method available in PredicProtein [34]. The modeled tertiary structure of the *Vibrio* chitinase was built by Swiss-Model and displayed by Swiss-Pdb Viewer [35] using the x-ray structure of *S. marcescens* chitinase A E315L mutant complex with hexaNAG (PDB code: 1NH6) as structure template. The co-ordinates of [GlcNAc]<sub>6</sub> were modeled into the active site of the *Vibrio* enzyme and the target residues were located by superimposing the C $_{\alpha}$  atoms of 459 residues of *V. carchariae* chitinase A with the equivalent residues of *S. marcescens* E315L complex, using the program Superpose available in the CCP4 suit [36]. The predicted structure was viewed with Pymol [37].

### Mutation design and site-directed mutagenesis

Site-directed mutagenesis was carried out by PCR using QuickChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene). The pQE60 plasmid harbouring chitinase A DNA lacking the residues 598–850 C-terminal fragment was used as DNA template [25]. The primers (Bio Service Unit, Thailand) used for the mutagenesis are summarized in Table 3. The success of newly-generated mutations was confirmed by automated DNA sequencing (BSU, Thailand). The programs used for nucleotide sequence analyses were obtained from the DNASTAR package (DNASTAR, Inc., Madison, USA).

### Expression and purification of recombinant wild-type and mutant chitinases

The pQE60 expression vector harboring the DNA fragment that encodes wild-type chitinase A were highly expressed in *E. coli* M15 cells and the recombinant proteins purified as described elsewhere [28]. Briefly, the cells were grown at 37°C in Luria Bertani (LB) medium containing 100  $\mu$ g/ml ampicillin until OD<sub>600</sub> reached 0.6, and then 0.5 mM of isopropyl thio- $\beta$ -D-galactoside (IPTG) was added to the cell culture for chitinase production. After 18 h of induction at 25°C, the cell pellet was collected by centrifugation, re-suspended in 15 ml of lysis buffer (20 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0, containing 150

**Table 3: Primers used for mutagenesis**

Point mutation	Oligonucleotide sequence
Ser33→Ala	Forward 5'-CGATATGTACGGT <u>GCG</u> <sup>a</sup> AATAACCTTCAATTTTC-3' Reverse 5'-GAAAATTGAAGGTTATT <u>CGC</u> ACCGTACATATCG-3'
Ser33→Trp	Forward 5'-CGATATGTACGGT <u>TGG</u> AATAACCTG <sup>b</sup> CAATTTTC-3' Reverse 5'-GAAAATTG <b>CAG</b> GTTATT <u>CCA</u> ACCGTACATATCG-3'
Trp70→Ala	Forward 5'-GAAATTTAACCAG <u>GCG</u> AGTGGCACATCTG-3' Reverse 5'-CAGATGTGCCACT <u>GCG</u> CTGGTTAAATTTTC-3'
Trp231→Ala	Forward 5'-GTTATCCAT <b>GAT</b> CCG <u>GCG</u> gcagcttctc-3' Reverse 5'-GATAAGCTG <u>CGC</u> CGGATCATGGATAAC-3'
Trp231→Phe	Forward 5'-GGTTATCCATGACCCGTTTGCAGCTTATCAG-3' Reverse 5'-CTGATAAGCTGCAACGGGTCTGGATAACC-3'
Tyr245→Trp	Forward 5'-CAGGTCATGAATGGAGCACGCAATCAAG-3' Reverse 5'-CTTGATTGGCGTGCTCCATTCATGACCTG-3'

<sup>a</sup> Sequences underlined indicate the mutated codons.

<sup>b</sup> Sequences in bold represent the codon being modified to achieve the  $T_m$  value as required for QuickChange site-directed mutagenesis.

mM NaCl, 1 mM phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF), and 1.0 mg/ml lysozyme), and then lysed on ice using an Ultrasonic homogenizer. The supernatant obtained after centrifugation at 12,000 g for 1 h was instantly subjected to Ni-NTA agarose affinity chromatography following the Qiagen's protocol. After SDS-PAGE analysis [38], the chitinase containing fractions were pooled and then applied to Vivaspin-20 membrane filtration (Mr 10 000 cut-off, Vivascience AG, Hannover, Germany) to concentrate the protein and to remove imidazole. A final concentration of the protein was determined by Bradford's method [39] using a standard calibration curve constructed from BSA (0–25 µg).

#### Chitinase activity assays

The colorimetric assay was carried out in a 96-well microtiter plate using pNP-[GlcNAc]<sub>2</sub> (Bioactive Co., Ltd., Bangkok, Thailand) as substrate. A 100-µl assay mixture, comprising protein sample (10 µl), 500 µM pNP-(GlcNAc)<sub>2</sub>, and 100 mM sodium acetate buffer, pH 5.5, was incubated at 37°C for 10 min with shaking. After the reaction was terminated by the addition of 1.0 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (50 µl), the amount of p-nitrophenol (pNP) released was determined by A<sub>405</sub> in a microtiter plate reader (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Molar concentrations of the pNP product were estimated from a calibration curve of pNP (0–30 nmol). Alternatively, chitinase activity was measured by a reducing-sugar assay. The reaction mixture (500 µl), containing 1% (w/v) colloidal chitin (prepared based on Hsu & Lockwood [40]), 100 mM sodium acetate buffer, pH 5.5, and 100 µg chitinase A, was incubated at 37°C in a Thermomixer comfort (Eppendorf AG, Hamburg, Germany). After 15 min of incubation, the reaction was terminated by boiling at 100°C for 5 min, and then centrifuged at 5,000 g for 10 min to precipitate the remaining chitin. A 200-µl superna-

tant was then subjected to DMAB assay following Bruce *et al.* [41]. The release of the reducing sugars as detected by A<sub>585</sub> was converted to molar quantity using a standard calibration curve of [GlcNAc]<sub>2</sub> (0–1.75 µmol). For crystalline α-chitin, chitinase activity assay was carried out as described for colloidal chitin with 400 µg of chitinase A included in the assayed mixture.

#### Chitin binding assays

Chitin binding assays were carried out at 0°C to minimize hydrolysis. For time course studies, a reaction mixture (500 µl), containing 1.0 µmol enzyme, and 1.0 mg of chitin in 20 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0, was incubated at a required time of 0, 1.25, 2.5, 5, 10, 15, 20, 25, and 30 min, and then the supernatant was collected by centrifuging at 12000 g at 4°C for 10 min. Concentration of the remaining enzyme was determined by Bradford's method, while concentration of the bound enzyme ( $E_b$ ) was calculated from the difference between the initial protein concentration ( $E_i$ ) and the free protein concentration ( $E_f$ ) after binding.

The chitin binding assay was also carried out with crystalline chitin and colloidal chitin (Sigma-Aldrich Pte Ltd., The Capricorn, Singapore Science Park II, Singapore) as tested polysaccharides. A reaction (set as above) was incubated for 60 min at 0°C, then the chitin-bound enzyme was removed by centrifugation, and the concentration of the free enzyme was determined. For adsorption isotherm experiments, the reaction assay (also prepared as described above) containing varied concentrations of protein from 0 to 7.0 µM was incubated for 60 min. After centrifugation, concentration of free enzyme in the supernatant was determined. A plot of [ $E_b$ ] vs [ $E_f$ ] was subsequently constructed and the dissociation binding constants ( $K_d$ ) of wild-type and mutants were estimated using

a non-linear regression function in the GraphPad Prism software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA).

### Steady-state kinetics

Kinetic parameters of the chitinase variants were determined using chitohexaose or colloidal chitin as substrate. For chitohexaose, the reaction mixture (200 µl), containing 0–500 µM (GlcNAc)<sub>6</sub>, and 50 µg enzyme in 100 mM sodium acetate buffer, pH 5.5, was incubated at 37°C for 10 min. After boiling to 100°C for 3 min, the entire reaction mixture was subjected to DMAB assay as described earlier. For colloidal chitin, the reaction was carried out the same way as the reducing-sugar assay, but concentrations of colloidal chitin were varied from 0 to 5.0% (w/v). The amounts of the reaction products produced from both substrates were determined from a standard curve of [GlcNAc]<sub>2</sub> (0–1.75 µmol). The kinetic values were evaluated from three independent sets of data using the nonlinear regression function obtained from the GraphPad Prism software.

### Abbreviations

GlcNAc<sub>n</sub>: β-1–4 linked oligomers of N-acetylglucosamine residues where n = 1–6; DMAB: p-dimethylaminobenzaldehyde; IPTG: Isopropyl thio-β-D-galactoside; PMSF: Phenylmethylsulphonylfluoride.

### Authors' contributions

SP performed site-directed mutagenesis, recombinant expression, protein purification, and functional characterization. CS carried out the sturcture-based sequence alignment and the molecular modeling of the tertiary structure of *V. carchariae* chitinase A. WS initiated the ideas of research, was involved in primer design and site-directed mutagenesis, performed data analyses, and prepared the manuscript.

### Acknowledgements

This work was financially supported by Suranaree University of Technology; The Thailand Research Fund (TRF) and The Thai Commission on Higher Education through a Research Career Development Grant to WS (grant no RMU4980028) and a TRF-Master Research Grant to SP (grant no MRG4955044).

### References

- Yu C, Lee AM, Bassler BL, Roseman S: **Chitin utilization by marine bacteria. A physiological function for bacterial adhesion to immobilized carbohydrates.** *J Biol Chem* 1991, **266**:24260-24267.
- Rast DM, Horsch M, Furter R, Gooday GW: **A complex chitolytic system in exponentially growing mycelium of *Mucor rouxii*: properties and function.** *J Gen Microbiol* 1991, **137**:2797-2810.
- Merzendorfer H, Zimoch L: **Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases.** *J Exp Biol* 2003, **206**:4393-4412.
- Herrera-Estrella A, Chet I: **Chitinases in biological control.** *EXS* 1999, **87**:171-184.
- Melchers LS, Stuver MH: **Novel genes for disease-resistance breeding.** *Curr Opin Plant Biol* 2000, **3**:147-152.
- Patil RS, Ghormade VV, Deshpande MV: **Chitinolytic enzymes: an exploration.** *Enzyme Microb Technol* 2000, **26**:473-483.
- Donnelly LE, Barnes PJ: **Acidic mammalian chitinase – a potential target for asthma therapy.** *TRENDS in Pharmacol Sci* 2004, **25**:509-511.
- Wills-Karp M, Karp CL: **Chitin checking-novel insights into asthma.** *N Engl J Med* 2004, **351**:1455-1457.
- Terwisscha van Scheltinga AC, Kalk KH, Beintema JJ, Dijkstra BW: **Crystal structures of hevamine, a plant defence protein with chitinase and lysozyme activity, and its complex with an inhibitor.** *Structure* 1994, **15**:1181-1189.
- Perrakis A, Tews I, Dauter Z, Oppenheim AB, Chet I, Wilson KS, Vorgias CE: **Crystal structure of a bacterial chitinase at 2.3 Å resolution.** *Structure* 1994, **15**:1169-1180.
- Hart PJ, Pfluger HD, Monzingo AF, Hollis T, Robertus JD: **The refined crystal structure of an endochitinase from *Hordeum vulgare* L. seeds at 1.8 Å resolution.** *J Mol Biol* 1995, **248**:402-413.
- Watanabe T, Oyanagi W, Suzuki K, Tanaka H: **Chitinase system of *Bacillus circulans* WL-12 and importance of chitinase A1 in chitin degradation.** *J Bacteriol* 1990, **172**:4017-4022.
- Suzuki K, Sugawara N, Suzuki M, Uchiyama T, Katouno F, Nikaidou N, Watanabe T: **Chitinases A, B, and C1 of *Serratia marcescens* 2170 produced by recombinant *Escherichia coli*: enzymatic properties and synergism on chitin degradation.** *Biosci Biotechnol Biochem* 2002, **66**:1075-1083.
- Montgomery MT, Kirchman DL: **Role of chitin-binding proteins in the specific attachment of the marine bacterium *Vibrio harveyi* to chitin.** *Appl Environ Microbiol* 1993, **59**:373-379.
- Tsujibo H, Orikoshi H, Baba N, Miyahara M, Miyamoto K, Yasuda M, Inamori Y: **Identification and characterization of the gene cluster involved in chitin degradation in a marine bacterium, *Alteromonas* sp. strain O-7.** *Appl Environ Microbiol* 2002, **68**:263-270.
- Suginta W: **Identification of chitin binding proteins and characterization of two chitinase isoforms from *Vibrio alginolyticus* 283.** *Enzyme Microb Tech* 2007, **41**:212-220.
- Watanabe T, Ishibashi A, Ariga Y, Hashimoto M, Nikaidou N, Sugiyama J, Matsumoto T, Nonaka T: **Trp122 and Trp134 on the surface of the catalytic domain are essential for crystalline chitin hydrolysis by *Bacillus circulans* chitinase A1.** *FEBS Lett* 2001, **494**:74-78.
- Uchiyama T, Katouno F, Nikaidou N, Nonaka T, Sugiyama J, Watanabe T: **Roles of the exposed aromatic residues in crystalline chitin hydrolysis by chitinase A from *Serratia marcescens* 2170.** *J Biol Chem* 2001, **276**:41343-41349.
- Katouno F, Taguchi M, Sakurai K, Uchiyama T, Nikaidou N, Nonaka T, Sugiyama J, Watanabe T: **Importance of exposed aromatic residues in chitinase B from *Serratia marcescens* 2170 for crystalline chitin hydrolysis.** *J Biochem (Tokyo)* 2004, **136**:163-168.
- Itoh Y, Watanabe J, Fukada H, Mizuno R, Kezuka Y, Nonaka T, Watanabe T: **Importance of Trp59 and Trp60 in chitin-binding, hydrolytic, and antifungal activities of *Streptomyces griseus* chitinase C.** *Appl Microbiol Biotechnol* 2006, **72**:1176-1184.
- Imai T, Watanabe T, Yui T, Sugiyama J: **Directional degradation of beta-chitin by chitinase A1 revealed by a novel reducing end labelling technique.** *FEBS Lett* 2002, **510**:201-205.
- Hult EL, Katouno F, Uchiyama T, Watanabe T, Sugiyama J: **Molecular directionality in crystalline beta-chitin: hydrolysis by chitinases A and B from *Serratia marcescens* 2170.** *Biochem J* 2005, **388**:851-856.
- Li Q, Wang F, Zhou Y, Xiao X: **Putative exposed aromatic and hydroxyl residues on the surface of the N-terminal domains of Chi1 from *Aeromonas caviae* CB101 are essential for chitin binding and hydrolysis.** *Appl Environ Microbiol* 2005, **71**:7559-7561.
- Suginta W, Robertson PAW, Austin B, Fry SC, Fothergill-Gilmore LA: **Chitinases from *Vibrio*: activity screening and purification of Chi A from *Vibrio carchariae*.** *J Appl Microbiol* 2000, **89**:76-84.
- Suginta W, Vongsuwan A, Songsiririthigul C, Prinz H, Estibeiro P, Duncan RR, Svasti J, Fothergill-Gilmore LA: **An endochitinase A from *Vibrio carchariae*: cloning, expression, mass and sequence analyses, and chitin hydrolysis.** *Arch Biochem Biophys* 2004, **424**:171-180.
- Suginta W, Vongsuwan A, Songsiririthigul C, Svasti J, Prinz H: **Enzymatic properties of wild-type and active site mutants of chi-**

- tinase A from *Vibrio carchariae*, as revealed by HPLC-MS. *FEBS J* 2005, **272**:3376-386.
27. Tews I, Terwisscha van Scheltinga AC, Perrakis A, Wilson KS, Dijkstra BW: **Substrate-assisted catalysis unifies two families of chitinolytic enzymes.** *J Am Chem Soc* 1997, **119**:7954-7959.
  28. Suginta W, Songsiriritthigul C, Kobdaj A, Opassiri R, Svasti J: **Mutations of Trp275 and Trp397 altered the binding selectivity of *Vibrio carchariae* chitinase A.** *Biochim Biophys Acta* 2007, **1770**:1151-1160.
  29. Watanabe T, Ito Y, Yamada T, Hashimoto M, Sekine S, Tanaka H: **The roles of the C-terminal domain and type III domains of chitinase A1 from *Bacillus circulans* WL-12 in chitin degradation.** *J Bacteriol* 1994, **176**:4465-4472.
  30. Ikegami T, Okada T, Hashimoto M, Seino S, Watanabe T, Shirakawa M: **Solution Structure of the chitin-binding domain of *Bacillus circulans* WL-12 chitinase A1.** *J Biol Chem* 2000, **275**:13654-13661.
  31. Li Y, Irwin DC, Wilson DB: **Processivity, substrate binding, and mechanism of cellulose hydrolysis by *Thermobifida fusca* Cel9A.** *Appl Environ Microbiol* 2007, **73**:3165-3172.
  32. Watanabe T, Ariga Y, Sato U, Toratani T, Hashimoto M, Nikaidou N, Kezuka Y, Nonaka T, Sugiyama J: **Aromatic residues within the substrate-binding cleft of *Bacillus circulans* chitinase A1 are essential for hydrolysis of crystalline chitin.** *Biochem J* 2003, **376**:237-244.
  33. **The National Resource for Biomedical Supercomputing (NRBSC)** [<http://www.psc.edu/biomed/genedoc/>]
  34. **PredictProtein** [<http://www.predictprotein.org/>]
  35. **Swiss-Model** [<http://swissmodel.expasy.org/>]
  36. Collaborative Computational Project, No.4: **The CCP4 suite: programs for protein crystallography.** *Acta Crystallogr* 1994, **D50**:760-763.
  37. **PyMol** [<http://www.pymol.org/>]
  38. Laemmli UK: **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** *Nature* 1970, **227**:680-685.
  39. Bradford MM: **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *Anal Biochem* 1976, **72**:248-254.
  40. Hsu SC, Lockwood JL: **Powdered chitin agar as a selective medium for enumeration of actinomycetes in water and soil.** *Appl Microbiol* 1975, **29**:422-426.
  41. Bruce A, Srinivasan U, Staines HJ, Highley TL: **Chitinase and laminarinase production in liquid culture by *Trichoderma* spp. and their role in biocontrol of wood decay fungi.** *Int Biodeterior Bio-degrad* 1995, **35**:337-353.

Publish with **BioMed Central** and every scientist can read your work free of charge

"BioMed Central will be the most significant development for disseminating the results of biomedical research in our lifetime."

Sir Paul Nurse, Cancer Research UK

Your research papers will be:

- available free of charge to the entire biomedical community
- peer reviewed and published immediately upon acceptance
- cited in PubMed and archived on PubMed Central
- yours — you keep the copyright

Submit your manuscript here:  
[http://www.biomedcentral.com/info/publishing\\_adv.asp](http://www.biomedcentral.com/info/publishing_adv.asp)





## Crystal structures of *Vibrio harveyi* chitinase A complexed with chitooligosaccharides: Implications for the catalytic mechanism

Chomphunuch Songsiriritthigul<sup>a,b</sup>, Supansa Pantoom<sup>a</sup>, Adeleke H. Aguda<sup>c,d</sup>, Robert C. Robinson<sup>c</sup>, Wipa Suginta<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>School of Biochemistry, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima 30000, Thailand

<sup>b</sup>National Synchrotron Research Center, Nakhon Ratchasima 30000, Thailand

<sup>c</sup>Institute of Molecular and Cell Biology, Proteos, 61 Biopolis Drive, Singapore 138673, Singapore

<sup>d</sup>Department of Biology, University of Virginia, Charlottesville, VA 22904, USA

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 13 December 2007

Received in revised form 14 March 2008

Accepted 18 March 2008

Available online 26 March 2008

#### Keywords:

Chitinase

Chitin oligosaccharide

Crystal structure

The slide-and-bend mechanism

*Vibrio harveyi*

### ABSTRACT

This research describes four X-ray structures of *Vibrio harveyi* chitinase A and its catalytically inactive mutant (E315M) in the presence and absence of substrates. The overall structure of chitinase A is that of a typical family-18 glycosyl hydrolase comprising three distinct domains: (i) the amino-terminal chitin-binding domain; (ii) the main catalytic ( $\alpha/\beta$ )<sub>8</sub> TIM-barrel domain; and (iii) the small ( $\alpha + \beta$ ) insertion domain. The catalytic cleft of chitinase A has a long, deep groove, which contains six chitooligosaccharide ring-binding subsites (−4)(−3)(−2)(−1)(+1)(+2). The binding cleft of the ligand-free E315M is partially blocked by the C-terminal (His)<sub>6</sub>-tag. Structures of E315M-chitooligosaccharide complexes display a linear conformation of pentaNAG, but a bent conformation of hexaNAG. Analysis of the final  $2F_o - F_c$  omit map of E315M-NAG6 reveals the existence of the linear conformation of the hexaNAG at a lower occupancy with respect to the bent conformation. These crystallographic data provide evidence that the interacting sugars undergo conformational changes prior to hydrolysis by the wild-type enzyme.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

### 1. Introduction

Chitin, a highly stable homopolysaccharide of  $\beta$  (1 → 4)-linked N-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc or NAG)<sup>1</sup> is widely distributed in the shells of crustaceans; the cuticles of insects; the shells and skeletons of molluscs; and the cell walls of fungi. Chitin degradation is of considerable interest because the products have potential applications in the fields of biomedicine, agriculture, nutrition, and biotechnology. Chitinases (EC 3.2.1.14) are major enzymes that hydrolyse chitin into oligosaccharide fragments. These enzymes are found in organisms that possess chitin as a constituent or that use it as a nutrient source. Bacteria produce chitinases in order to utilise chitin as a source of carbon and nitrogen (Bhattacharya et al., 2007; Keyhani and Roseman, 1999). Fungal chitinases play a similar nutritional role but are additionally involved in fungal development and morphogenesis (Kuranda and Robbins, 1991; Sahai and Manocha, 1993). Plants produce chitinases as a defence mechanism against pathogenic fungi (Leah et al., 1991). Animal chitinases are involved

in dietary uptake processes (Jeuniaux, 1961). Human chitinases are responsible for hyperresponsiveness and inflammation of the airways of allergic asthma patients (Donnelly and Barnes, 2004; Kawada et al., 2007).

The carbohydrate active enzyme (CAZy) database (<http://www.cazy.org/>) classifies carbohydrate enzymes into functional families (glycosyl hydrolases, glycosyl transferases, polysaccharide lyases, carbohydrate esterases, and carbohydrate-binding modules), which are further subdivided into structurally related families designated by number. Following this classification, chitinases are listed as GH family-18 and GH family-19. These two families show no homology in both structure and mechanism. The catalytic domain of family-18 chitinases consists of an ( $\alpha/\beta$ )<sub>8</sub>-barrel with a deep substrate-binding cleft formed by loops following the C-termini of the eight parallel  $\beta$ -strands (Fukamizo, 2000; Hollis et al., 2000; Perrakis et al., 1994; Terwisscha van Scheltinga et al., 1996). In contrast, the catalytic domain of family-19 chitinases comprises two lobes, each of which is rich in  $\alpha$ -helical structure (Hart et al., 1995). Family-18 chitinases are known to catalyse the hydrolytic reaction through the 'substrate-assisted' or 'retaining mechanism' (Brameld and Goddard, 1998a; Terwisscha van Scheltinga et al., 1995; Tews et al., 1997), whereas family 19 chitinases employ the 'single displacement' or 'inversion mechanism' (Brameld and Goddard, 1998b). The catalytic mechanism of family-18 chitinases involves protonation of the leaving

\* Corresponding author. Fax: +66 44 224185.

E-mail address: [wipa@sut.ac.th](mailto:wipa@sut.ac.th) (W. Suginta).

<sup>1</sup> Abbreviations used: GlcNAc or NAGn,  $\beta$ -1-4 linked oligomers of N-acetylglucosamine residues where n = 1–6; pNP-[GlcNAc]<sub>2</sub>, p-nitrophenyl- $\beta$ -D-N,N'-diacetylchitobioside; IPTC, isopropyl thio- $\beta$ -D-galactoside; PMSF, phenylmethylsulfonylfluoride; ChBD, the amino-terminal chitin-binding domain.



group by an absolutely conserved glutamic acid (equivalent to Glu315 of *Serratia marcescens* chitinase A), followed by substrate distortion into a 'boat' conformation at subsite –1 and the stabilisation of an oxazolinium intermediate by the sugar *N*-acetamido group. The resultant bond cleavage yields the retention of anomeric configuration in the products (Armand et al., 1994; Fukamizo et al., 2001; Honda et al., 2004; Sasaki et al., 2002).

Chitinases from both families are further divided into exo- and endochitinases. Exochitinase activity represents a progressive action that starts at the non-reducing end of a chitin chain and successively releases diacetylchitobiose (NAG<sub>2</sub>) units, whereas endochitinase activity involves random cleavage at internal points within a chitin chain (Robbins et al., 1988). The active sites of family-18 endochitinases, such as *S. marcescens* chitinase A and *Hevea brasiliensis* chitinase (hevine), are groove-like structures with openings above and at both ends (Brameld and Goddard, 1998a; Hart et al., 1995). In contrast, the active sites of exochitinases, such as *S. marcescens* ChiB, have tunnel-like morphologies (Van Aalten et al., 2001).

We previously isolated the Chi A gene encoding the 95-kDa chitinase precursor (GenBank Accession No: Q9AMP1) from the genome of *Vibrio carchariae* type strain LMG7890. Based on genotypical and phenotypical features analysed by Pedersen et al. (1998), *V. carchariae* has been re-classified as a heterotypic synonym of *Vibrio harveyi*. To follow the new systematic taxonomy, *V. carchariae* will be referred to as *V. harveyi* in this and later studies. *V. harveyi* (formerly *V. carchariae*) is a marine bacterium that secretes high levels of a 63-kDa endochitinase A (Suginta et al., 2000). This family-18 glycosyl hydrolase shows greatest affinity towards chitohexamer, which suggests the substrate-binding cleft of this enzyme that comprises an array of six GlcNAc-binding sites (Suginta et al., 2005), comparable to that of *S. marcescens* Chi A and hevamine (Papanikolaou et al., 2001; Perrakis et al., 1994; Terwisscha van Scheltinga et al., 1996). The gene that encodes chitinase A without the 253-aa C-terminal propeptide fragment was subsequently cloned and functionally expressed in *Escherichia coli* (Suginta et al., 2004). Substitution of Glu315 to Met/Gln completely abolished the hydrolysing activity against soluble and insoluble substrates, confirming that this residue is essential for catalysis (Suginta et al., 2005).

In this study, we describe the crystal structures of *V. harveyi* chitinase A and its catalytically inactive E315M mutant, as well as the E315M mutant soaked with NAG5 and NAG6. The overall structures of E315M with and without substrates are almost identical to the wild-type structure. However, the relative conformations of NAG5 and NAG6 bound to E315M are very different. These static structures provide hints to the conformational changes in chitooligosaccharide conformation during binding and hydrolysis, allowing for a catalytic mechanism of the enzyme to be proposed.

## 2. Experimental procedures

### 2.1. Cloning, recombinant expression, and purification

Wild-type chitinase A (amino-acid residues 22–597) and mutant E315M were cloned into the C-terminal (His)<sub>6</sub> tag pQE60 expression vector, and were highly expressed in *E. coli* type strain M15 (Suginta et al., 2004). For protein purification, IPTG-induced bacterial cells obtained from 1-L culture were collected by centrifugation and then resuspended in 20 ml of 20 mM Tris–HCl (pH 8.0) containing 150 mM NaCl, 1 mg ml<sup>−1</sup> lysozyme, and 1 tablet of cOmplete EDTA-free, Protease Inhibitor Cocktail (Roche Diagnostics GmbH, Roche Applied Science, Germany). The cells were lysed on ice using a Misonix Sonicator 3000 (New Highway

Farmingdale, NY, USA) with a 20-mm-diameter probe. After the removal of cell debris by centrifugation, the supernatant was filtered through a SFCA membrane (0.2 μm pore size, Nalgene, Rochester, NY, USA) prior to application to two HisTrap HP 1-ml columns connected in series using an ÄKTAexpress purification system (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) and a flow rate of 2.8 ml min<sup>−1</sup>. The columns were washed with 5 mM, followed by 20 mM, imidazole before being eluted with 250 mM imidazole in 20 mM Tris–HCl (pH 8.0), containing 150 mM NaCl. The protein-containing fractions were collected, concentrated using Vivaspin-20 membrane concentrator (Mr 10,000 cut-off, Vivascience AG, Hannover, Germany), and then further purified by an ÄKTAexpress system using a HiLoad 16/60 Superdex 200 prep grade (Amersham Biosciences) with a flow rate of 1.2 ml min<sup>−1</sup>. Chitinase-containing fractions were combined, exchanged into 10 mM Tris–HCl (pH 8.0), and concentrated to 10–20 mg ml<sup>−1</sup> using the Vivaspin membrane concentrator. All purification steps were carried out at 277 K. Protein concentrations were determined by the Coomassie Plus Kit (Pierce, Rockford, IL, USA) using a standard calibration curve constructed from BSA (0–20 μg). The purity of chitinase A was verified by SDS–PAGE (Laemmli, 1970). Chitinase activity was determined by colorimetric assay using pNP-[GlcNAc]<sub>2</sub> as substrate (Suginta et al., 2007) or by the reducing sugar assay using colloidal chitin as substrate (Bruce et al., 1995).

### 2.2. Protein crystallisation

Initial crystallisation trials of the wild-type chitinase A were set up using a Screenmaker 96+8™ Robot (Innovadyne Technologies, Inc., Santa Rosa, CA, USA) with sitting drop CrystalQuick™ plates (Greiner bio-one, Frickenhausen, Germany). For each crystallisation drop, 20 nl of freshly prepared enzyme (20 mg ml<sup>−1</sup>) in 10 mM Tris–HCl (pH 8.0), was added to 20 nl of each precipitating agent obtained commercially (Crystal Screen HT & SaltRx HT from Hampton Research, Aliso Viejo, CA, USA, and JBScreen HTS I & II from Jena Bioscience GmbH, Jena, Germany). Crystal growth optimisation with macro seeding was carried out under several JBScreen HTS II precipitant conditions. Diffraction quality crystals, dimensions 230 × 100 × 15 μm<sup>3</sup>, were produced within two days at 288 K when a protein drop (5 mg ml<sup>−1</sup>) was equilibrated in 1.2 M ammonium sulphate and 0.1 M Tris–HCl (pH 8.0). The E315M crystals were obtained from 20% (w/v) PEG 4000, 0.1 M ammonium sulphate and 0.1 M Tris–HCl (pH 7.5) and reached final dimensions of 100 × 30 × 50 μm<sup>3</sup> after 1 week equilibration at 288 K. Prior to soaking experiments, single crystals of E315M grown under 16% (w/v) PEG 4000, 0.1 M MgCl<sub>2</sub> in 0.1 M HEPES (pH 7.0) were transferred to a cryoprotectant solution containing mother liquor with 20% (w/v) PEG 4000, and 10% (v/v) glycerol and 10 mM NAG5 or NAG6. The crystals were then soaked overnight at 288 K before being mounted directly into a nitrogen cryostream for data collection.

### 2.3. Data collection, processing, and structure determination

All the X-ray diffraction data were collected by a Rikagu/MSCFR-E Super Bright equipped with an R-Axis IV++ imaging plate detector. Data processing was conducted with the program MOSFLM (Leslie, 1991) and molecular replacement was employed to obtain phase information using the program AmoRe from the CCP4 suite (Navaza, 1994). The E315M data set was solved using the crystal structure of *S. marcescens* chitinase A (PDB code 1CTN; 47% identical to *V. harveyi* chitinase A) as a search model. Alternate sessions of model rebuilding in O (Jones et al., 1991) and restrained refinement in REFMAC from the CCP4 suite (Collaborative Computational Project Number 4, 1994; Murshudov et al.,

1997) were continued until the values of the free *R*-factor converged. Crystallographic data and refinement statistics of the chitinase structures are summarised in Table 1.

The final model of E315M was employed as the model for the subsequent three data sets of E315M+NAG5, E315M+NAG6, and the wild-type enzyme. Sugar coordinates taken from the protein databank (PDB code 1NH6) were modelled into the  $2F_o - F_c$  and  $F_o - F_c$  maps, and further refined. During the model rebuilding process, the non-reducing end unit of NAG5 (–4NAG) showed poor electron density. Examination of the refined structure of E315M+NAG6 exhibited ambiguity in the electron density of the +1 NAG and –1NAG in the  $2F_o - F_c$  omit map showing partial density for the NAG5 conformation. The final free *R*-factors from modelling NAG6, NAG5, or no ligand into the E315M+NAG6 data are 21.0%, 21.4%, and 21.7%, respectively.

Tight non-crystallographic symmetry restraints were initially employed in refining the wild-type structure but later released as judged by the free *R*-factor. The geometry of each final model was verified by PROCHECK (Laskowski et al., 1993). No residues lie in the disallowed regions of the Ramachandran plots. Three residues (590, 591, and 592) could not be modelled into the E315M structures due to their poor electron density. The C-terminal hexahistidine tag was clear in the electron density of the ligand-free E315M but absent from the other structures. The refined structures of the four enzyme forms were compared within the program Superpose and direct contacts determined in the program Contact (CCP4 suite). The structures and electron density maps were created and displayed by Pymol ([www.pymol.org](http://www.pymol.org)).

## 2.4. Fluorescence studies of chitooligosaccharide binding

The interactions of NAG5 and NAG6 with E315M/Q were studied by fluorescence spectroscopy. The purified proteins (0.25  $\mu$ M) were titrated with ligand (0.01–20  $\mu$ M) in 20 mM Tris–HCl (pH 8.0) and changes in the intrinsic tryptophan fluorescence (Srivastava et al., 2006) were directly monitored on an LS-50 fluorescence spectrometer (Perkin-Elmer Limited (Instruments & Life Sciences), Bangkok, Thailand). The measurements were conducted at 25 °C with an excitation wavelength of 295 nm and emission intensities collected over 300–450 nm. The excitation and emission slit widths were kept at 5 nm. Each protein spectrum was corrected for the buffer spectrum. The fluorescence intensity data were analysed by non-linear regression function available in GraphPad Prism version 3.0 (GraphPad Software, California, USA) using the following single-site-binding equation: where  $F - F_0 = \frac{(F_b - F_0) \times (L_0)}{K_d + (L_0)}$   $F$  and  $F_0$  refer to the fluorescence intensity in the presence and absence of ligand, respectively;  $F_b$  refers to the maximum fluorescence signal of the protein-ligand complex;  $L_0$  is the initial ligand concentration and  $K_d$  is the equilibrium dissociation constant.

## 3. Results and discussion

### 3.1. The overall structures of *V. harveyi* chitinase A

The overall structures of the native chitinase A, mutant E315M with and without substrates are essentially identical and closely

**Table 1**  
Statistics of data and structural refinement

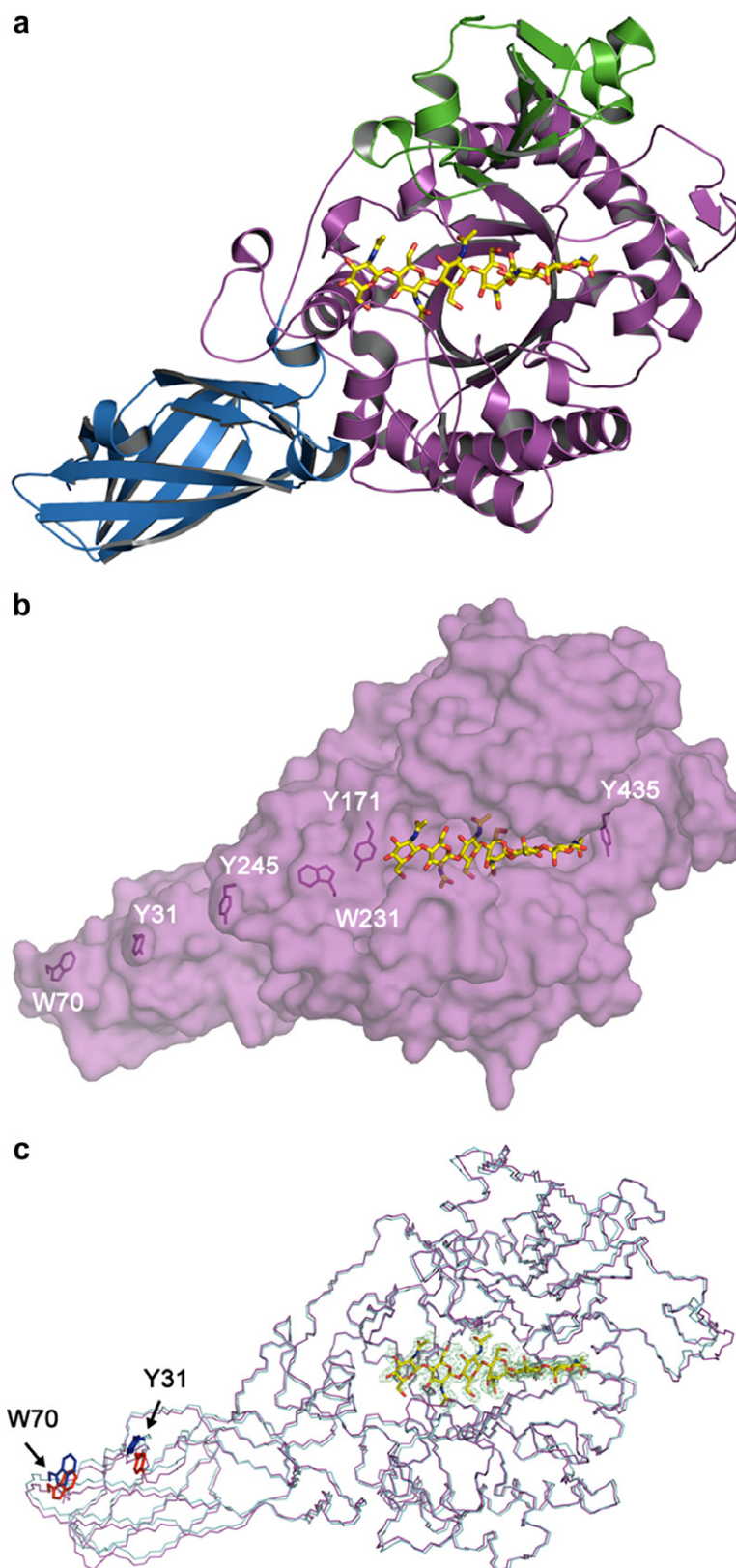
Crystal	Wild-type	E315M	E315M+NAG <sub>5</sub>	E315M+NAG <sub>6</sub>
<i>Data collection statistics</i>				
PDB code	3B8S	3B9E	3B9D	3B9A
Space group	P1	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>
Unit-cell parameters	<i>a</i> = 60.27 Å	<i>a</i> = 63.96 Å	<i>a</i> = 63.51 Å	<i>a</i> = 63.70 Å
	<i>b</i> = 64.28 Å	<i>b</i> = 83.11 Å	<i>b</i> = 83.08 Å	<i>b</i> = 83.32 Å
	<i>c</i> = 83.52 Å	<i>c</i> = 106.98 Å	<i>c</i> = 105.59 Å	<i>c</i> = 106.57 Å
	$\alpha$ = 91.74°	$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$
	$\beta$ = 91.18°			
	$\gamma$ = 112.91°			
Resolution range <sup>a</sup> (Å)	24.62–2.11 (2.00)	24.68–1.79 (1.70)	24.54–1.81 (1.72)	30–1.90 (1.80)
Solvent content (%)	46.9	44.85	43.70	44.55
Unique reflections	73693 (10404)	61563 (7880)	59561 (8247)	53131 (7564)
Observed reflections	292719 (41321)	607216 (59894)	406849 (45783)	452556 (63380)
Multiplicity	4.0 (4.0)	9.9 (7.6)	6.8 (5.6)	8.5 (8.4)
Completeness (%)	94.6 (91.9)	97.2 (87.2)	99.2 (95.6)	99.7 (99.0)
( <i>I</i> /σ( <i>I</i> ))	19.5 (5.5)	26.9 (4.5)	26.3 (9.9)	26.3 (6.1)
<i>R</i> <sub>merge</sub> <sup>b</sup> (%)	6.6 (22.8)	7.1 (36.1)	7.1 (12.3)	7.0 (31.2)
<i>Refinement statistics</i>				
<i>R</i> <sub>factor</sub> <sup>c</sup> (%)	16.8	18.9	18.7	18.1
<i>R</i> <sub>free</sub> <sup>d</sup> (%)	20.5	21.9	21.5	21.0
No. of amino acid residues	1134	581	567	567
No. of protein atoms	8708	4474	4353	4353
No. of carbohydrate atoms	—	—	57	85
No. of ordered waters	1091	740	664	690
<i>R.M.S. deviations</i>				
Bond length	0.007	0.006	0.006	0.006
Bond angle	0.968	0.932	0.962	0.990
<i>Mean atomic</i>				
B values Protein atoms	14.45	15.10	14.24	13.74
Substrate	—	—	19.82	21.79
Waters	24.46	25.69	24.92	25.42
Overall	16.19	16.60	15.70	15.45

<sup>a</sup> Values in parentheses refer to the corresponding values of the highest resolution shell.

<sup>b</sup>  $R_{\text{merge}} = \frac{\sum_{hkl} \sum_i |I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle|}{\sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)}$  where  $I_i$  is the intensity for the *i*th measurement of an equivalent reflection with indices *hkl*.

<sup>c</sup>  $R_{\text{factor}} = \frac{\sum |F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}|}{\sum |F_{\text{obs}}|}$  where  $F_{\text{obs}}$  and  $F_{\text{calc}}$  are the observed and calculated structure-factors.

<sup>d</sup>  $R_{\text{free}} = \frac{\sum |F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}|}{\sum |F_{\text{obs}}|}$  calculated from 5% of the reflections selected randomly and omitted from the refinement process.



**Fig. 1.** The overall structure of *V. harveyi* chitinase A (a) The structure of catalytically inactive mutant E315M complexed with NAG<sub>6</sub>. The N-terminal ChBD domain is in blue, the catalytic TIM-barrel domain in magenta, and the small insertion domain in green. (b) Surface representation of E315M showing the positions of the regularly spaced, surface-exposed hydrophobic residues. Y435 marks the reducing end of NAG<sub>6</sub> and Y171 marks the non-reducing end. The linear track of hydrophobic residues extending away from the non-reducing end of NAG<sub>6</sub> suggests the binding path for longer chain chitins. (c) A superimposition of wild-type chitinase A with E315M+NAG<sub>6</sub>. The backbone structure of the wild-type is depicted in cyan and of E315M+NAG<sub>6</sub> in magenta. The residues Trp70 and Tyr31 located at the end of the ChBD and other aromatic residues located at the exterior of the TIM barrel domain (Y245, Trp231, Tyr171) and Tyr435 that marks the reducing end of the catalytic cleft are shown in blue for wild-type and red for E315M+NAG<sub>6</sub>. Sugar units are shown as  $2F_o - F_c$  map and sticks (yellow).



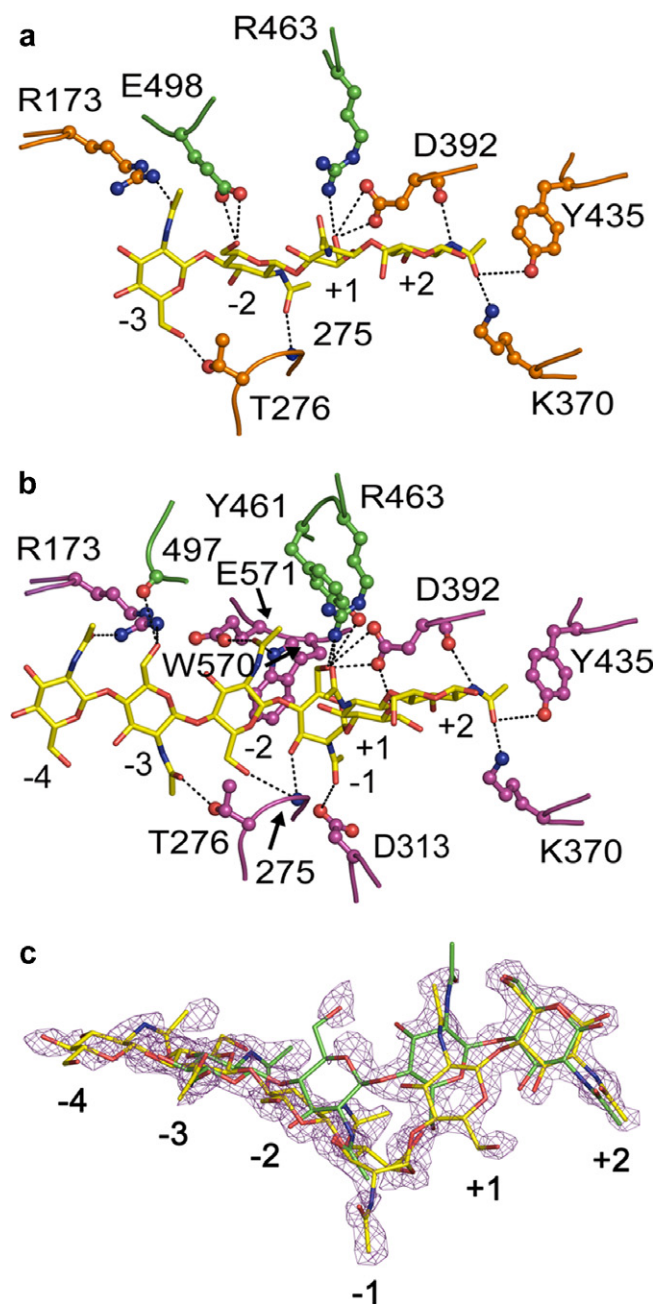
resemble those of chitinase A from *S. marcescens* and chitinase-1 from the pathogenic fungus *Coccidioides immitis* with minor dissimilarities in loop and helical regions (Perrakis et al., 1994; Hollis et al., 2000). Fig. 1a represents the structure of the chitinase A E315M mutant, which comprises three distinct domains, bound to hexaNA<sub>6</sub>. The amino-terminal chitin-binding domain (ChBD, blue) has a  $\beta$ -strand-rich fold formed by residues 22–138. This domain is connected to the core domain by a 21 amino-acid linker peptide (residues 139–159). The catalytic domain (magenta) has a  $(\alpha/\beta)_8$ -TIM barrel fold consisting of eight  $\beta$ -strands (B1–B8) tethered to eight  $\alpha$ -helices (A1–A8) by loops and is made up of two parts, referred to as Cat I (residues 160–460) and Cat II (residues 548–588). The catalytic residue (Glu315) is positioned in the loop of strand B4, which is part of a DxxDxDxE conserved motif. The  $\alpha + \beta$ -fold insertion domain (green) connects strand B7 of Cat I and helix A7 of Cat II and is made up of five anti-parallel  $\beta$ -strands flanked by short  $\alpha$ -helices (residues 461–547). This small domain provides a signature for subfamily A chitinases (Suzuki et al., 1999), although its function remains to be identified. As observed in this study, a few residues from this domain contribute to binding both NAG<sub>5</sub> and NAG<sub>6</sub> (Fig. 2).

The four structures exhibit three notable common structural features: (i) Tyr171 is detected in a generously allowed region in the Ramachandran plot and lines in the substrate-binding pocket; (ii) three cis peptide bonds are formed between the residues Gly191–Phe192, Glu315–Phe316, and Trp570–Glu571, all located at the exterior of the catalytic cleft; and (iii) three internal disulfide bonds are observed, one of which (Cys116–Cys121) is found at the end of the ChBD, and two others (Cys196–Cys217 & Cys409–Cys418) are present on the surface of the substrate-binding cleft. The existence of the conserved non-proline cis peptide bonds in the structures of *S. marcescens* chitinase A, *C. immitis* chitinase-1 and hevamine has been proposed to achieve essential conformational constraints (Hollis et al., 2000; Perrakis et al., 1994; Terwisscha van Scheltinga et al., 1996). The three non-proline cis peptide bonds, the two Cys196–Cys217 and Cys409–Cys418 disulfide bonds and residue Tyr171 define a general outline of the active site of the *Vibrio* chitinase (data not shown).

As in other family-18 chitinase 3D-structures (Fusetti et al., 2002; Hollis et al., 2000; Matsumoto et al., 1999; Perrakis et al., 1994; Terwisscha van Scheltinga et al., 1994; Van Aalten et al., 2000), the catalytic domain of *V. harveyi* chitinase A is an  $(\alpha/\beta)_8$ -TIM barrel fold. The structure of E315M+NAG<sub>6</sub> complex reveals the substrate-binding cleft as a long, deep groove with estimated dimensions of 33 Å (long)  $\times$  14 Å (deep)  $\times$  13 Å (wide), which contains six-binding subsites (–4)(–3)(–2)(–1)(+1)(+2), Fig. 1b and 2c. This subsite topology defines subsite –4 at the non-reducing end (NRE), subsite +2 at the reducing end (RE) and the cleavage site between –1 and +1 sites. Similar subsites have been identified for *S. marcescens* chitinase A (Aronson et al., 2003; Papanikolaou et al., 2001). In contrast, NAG<sub>5</sub> occupies only four subsites (–3)(–2)(+1)(+2) of the binding cleft of E315M (Fig. 2a).

Four aromatic residues (Tyr31 & Trp70 from ChBD and Trp231 & Tyr245 at the edge of the non-reducing end of the substrate-binding sites) appear to line up in positions suitable for binding to longer chain chitins (Fig. 1b). Point mutations of these surface-exposed residues to Gly or Ala resulted in a notable decrease in the binding activity of *S. marcescens* Chi A, *B. circulans* Chi A1, and *Aeromonas caviae* Chi1 towards crystalline chitin (Li et al., 2005; Watanabe et al., 2001; Uchiyama et al., 2001). Our recent report further confirmed that Trp70 acts as the most crucial-binding residue for insoluble chitin, but had no effect on soluble chitoooligosaccharides (Pantoom et al., 2008).

Superimposition of the four structures gives R.M.S. deviations in C $\alpha$  positions of 0.63–0.77 Å for the 567 residues. Variation in the wild-type and the E315M+NAG<sub>6</sub> structures is apparent as a



**Fig. 2.** Specific interactions within the substrate-binding cleft of E315M. Interactions of (a) NAG<sub>5</sub> and (b) NAG<sub>6</sub>. Hydrogen bonds are shown as dashed lines (...). The binding residues are depicted as ball-and-stick with the sugar residues in a stick model. Carbon atoms of the binding residues in the catalytic domain are coloured orange for NAG<sub>5</sub> and magenta in NAG<sub>6</sub>. Green represents carbon in the small insertion domain and orange-yellow for sulphur. Sugar is coloured yellow for carbon; blue for nitrogen; and red for oxygen (c) The  $2F_o - F_c$  OMIT electron density in the substrate-binding cleft of E315M, contoured at 1.0  $\sigma$ . NAG<sub>5</sub> (green) and NAG<sub>6</sub> (yellow) are modelled into the density. NAG<sub>6</sub> fits well into the density, however, residual unexplained density suggests a partial occupancy of the NAG<sub>5</sub> conformation. (For interpretation of color mentioned in this figure the reader is referred to the web version of the article.)

slight variation in the angle between the ChBD and the catalytic domain (Fig. 1c). The catalytic domains of the two structures superimpose well but leave their ChBDs offset, resulting in a relative displacement of C $\alpha$ -Trp70 (the critical chitin-binding residue) of 1.46 Å and the C $\alpha$ -Tyr31 of 2.03 Å. This tilt suggests some innate flexibility between the two domains and may be involved in the sliding mechanism (as proposed by Watanabe et al., 2003) of a chi-

tin polymer and in the bending process of long-chain chitooligomers.

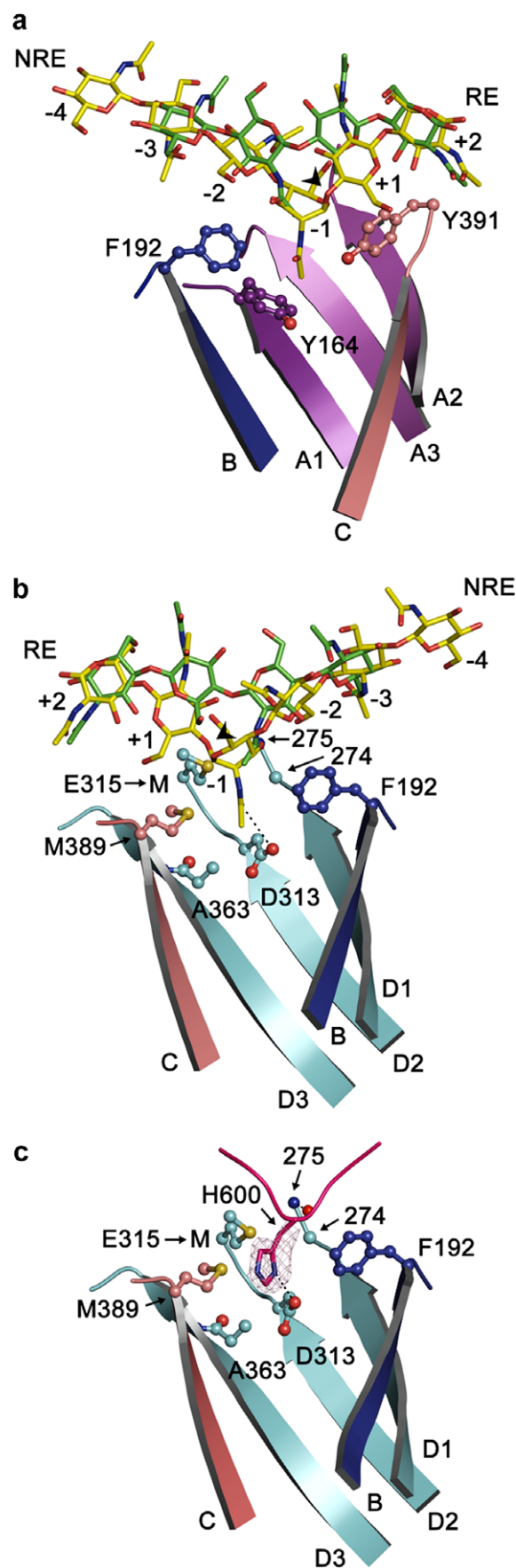
Two additional residues (Tyr171 and Tyr435) are found at the edges of the catalytic cleft (Fig. 1b). Tyr171 appears to mark the non-reducing end of the hexasaccharide chain. Whereas, Trp435 marks the reducing end of the both the penta- and hexasaccharide chains (Fig. 2). Tyr435 located at the end of the +2 site seems to provide a partial barrier that may favour the ending of both sugar chains. However, inspection of the electron density map of the reducing-end subsites displays adequate space for the incoming oligomer to move beyond the +2 site, allowing various glycosidic bonds to approach the cleavage site. This explains how *V. harveyi* chitinase A hydrolyses a polymeric substrate in an endo manner at the same time favouring smaller substrates, such as hexaNAg (Suginta et al., 2005).

### 3.2. Specific interactions within the substrate-binding cleft of E315M

Fig. 3 depicts the relative positioning of the studied oligosaccharides inside the substrate-binding cleft of E315M. Four discernible sugar units of NAG5 (the GlcNAc residues in green) are bound to subsites −3, −2, +1, and +2, leaving the −1 site lying empty. NAG5 makes a number of interactions, either via hydrogen bonds (Fig. 2a) or via hydrophobic interactions, with residues in the substrate-binding cleft of E315M. As summarised in Table 2, five residues (Trp275, Lys370, Asp392, Trp397, and Tyr435) are directly involved in binding to +2NAG, whilst four residues (Trp275, Glu315 → Met, Asp392, and Arg463) contribute in binding to +1NAG and another five residues (Phe192, Gly274, Trp275, Glu498, and Trp570) to −2NAG. Specific interactions with −3NAG are made by Trp168, Arg173, Val205, Thr276, Trp497, and Glu498. The final non-reducing sugar of NAG5 could not be modelled into subsite −4 due to its poor electron density, probably reflecting a weak interaction in this conformation.

In relation to NAG5, NAG6 displays a more extensive set of interactions around the cleavage site extending to the reducing-end subsites (sites −1, +1, and +2) with its six sugar rings are entirely engaged with all the binding sites of E315M (the GlcNAc residues in yellow, Fig. 2b and 3a and b). Table 2 lists seven and six residues that participate in binding to +2NAG and +1NAG, respectively. These residues include all the residues that bind to NAG5, complemented by two extra (hydrophobic) interactions at each subsite (Phe316 and Gly367 at +2 site and Phe316 and Met389 at +1 site).

The mode of binding at the −1 site of E315M is particularly distinctive, since NAG6 interacts with twelve residues within this site, but there are no interactions with NAG5. To investigate further which conformation favours hydrolysis, the distances between the glycosidic oxygen and the OE1 atom of the  $\gamma$ -carboxyl side chain of catalytic Glu315 were estimated through superposition onto the wild-type structure. This distance is 2.98 Å for NAG6. The strained conformation of −1NAG combined with the twist of



**Fig. 3.** A structural comparison of NAG<sub>5</sub> and NAG<sub>6</sub> in the catalytic cleft of E315M. (a) Superposition of E315M+NAG<sub>5</sub> onto E315M+NAG<sub>6</sub>. Both sugars are shown along with interacting residues at the catalytic site. Only one protein chain is shown for clarity. (b) A 180° rotation of (a). Hydrogen bonds are shown as dashed lines (...). The eight  $\beta$ -strands are defined as A1 (residues 160–165); A2 (residues 455–460); A3 (residues 566–571); B (residues 186–192); C (residues 384–389); D1 (residues 267–273); D2 (residues 308–313) and D3 (residues 358–366). Carbon atoms of the labeled amino acids are coloured purple for strands A1, A2, and A3; blue for strand B; deep salmon for strand C; pale cyan for strands D1, D2, and D3. The binding residues are depicted as ball-and-stick models and orange-yellow for sulphur. An arrow indicates the cleavage site. NRE and RE represent non-reducing end and reducing end, respectively. (c) The  $2F_o - F_c$  map of the His600 residue calculated from the final refined model and contoured at 1.0  $\sigma$ . Atoms in the histidine residue are labeled pink for carbon; blue for nitrogen and red for oxygen.

**Table 2**A summary of the interactions between NAG<sub>5</sub> and NAG<sub>6</sub> and the binding residues in the substrate-binding site of E315M

Binding subsites	E315M-binding residues <sup>a</sup>	
	pentaNAG	hexaNAG
+2	<b>Trp275<sup>b</sup>, Lys370, Asp392, Trp397, Tyr435</b>	<b>Trp275, Phe316, Gly367, Lys370, Asp392, Trp397, Tyr435</b>
+1	<b>Trp275, Glu315 → Met, Asp392, Arg463</b>	<b>Trp275, Glu315 → Met, Phe316, Met389, Asp392, Arg463</b>
–1	Not observable	Tyr164, Phe192, Trp275, Asp313, Glu315 → Met, Ala363, Met389, Tyr391, Asp392, Tyr461, Arg463, Trp570
–2	<b>Phe192, Gly274, Trp275, Glu498, Trp570</b>	<b>Phe192, Trp275, Thr276, Trp570, Glu571</b>
–3	<b>Trp168, Arg173, Val205, Thr276, Trp497, Glu498</b>	<b>Trp168, Arg173, Thr276, Trp497</b>
–4	Not observable	Tyr171, Arg173, Trp497

<sup>a</sup> Direct contacts of each NAG with its adjacent residues were estimated, with the residues exhibiting a contact distance of  $\leq 4$  Å being considered as binding residues.<sup>b</sup> Residues in bold are shared between E315+NAG<sub>5</sub> and E315+NAG<sub>6</sub>.

the bonds between –1NAG and +1NAG in the structure of NAG6 appear to present the scissile bond of NAG6 to the catalytic residue. However, the longer distance for NAG5 (5.06 Å) indicates that the position of the scissile linkage is too far away from Glu315 for hydrolysis to occur (see Fig. 3b), hence, a non-productive (non-hydrolysable) conformation is adopted by this sugar.

Fewer residues are engaged in coordination at the non-reducing end of NAG6 (four for –3NAG and three for –4 NAG) (Table 2). The larger number of contacts in the reducing-end binding sites probably reflects stronger interactions which may be of particular importance in defining the primary-binding sites for the incoming chitooligomer. Point mutations of Trp275 (binds to –1 and +1 NAG) and Trp397 (binds to +2 NAG), which caused a complete change in the cleavage patterns of the enzyme towards various chitooligosaccharides (Suginta et al., 2007), confirmed the binding-selectivity role of the reducing-end residues.

Most of the contacts for both NAG5 (orange, Fig. 2a) and NAG6 (magenta, Fig. 2b) involve the amino acid residues located within the catalytic domain. However, residues that belong to the  $\alpha + \beta$  insertion domain also contact the substrates (Glu498, Tyr461, Arg463, and Trp497, green, Fig. 2a and b). Partial contribution of this domain to substrate binding was also noticeable in the complex of *S. marcescens* E315Q+NAG8 as described by Papa-nikolau et al. (2001).

Examination of the final structure of ligand-free E315M revealed that the catalytic cleft of the substrate-free enzyme is partially occupied by the six histidine affinity tag. These histidine residues are attached to the C-terminal end of a neighbouring chitinase molecule within the crystal and mimic the structure of the sugar rings. His600 particularly resembles –1NAG and makes most contact with the residues that bind to –1 NAG in the complex E315M+NAG6 (Fig. 3c).

### 3.3. Comparison of chitooligosaccharide-binding modes

The structures of the E315M complexes exhibited different conformations of NAG5 and NAG6. In addition to subsites –1 and +4 being unoccupied, the four sugar rings of NAG5 in the E315M+NAG5 complex do not fully lie on top of their corresponding sites in NAG6, with –2NAG and +1NAG (the sugar rings occupying the –2 and +1 subsites, respectively) being particularly displaced (Fig. 3a and b). As a result, the sugar oligomer may be expected to be interacting in a suboptimal manner. The glycosidic bond that joins –3NAG and –2NAG is twisted, causing the plane of –3NAG to lie perpendicular to the planes of the remaining sugars (Fig. 2a). Yet, the sugar chain maintains a linear form with no conversion of the chair configuration of any of the sugar residues. This linear conformation may represent the initial step of binding, and therefore, it is referred to as the ‘recognition’ conformation.

A different substrate conformation is witnessed in the E315M+NAG6 complex. The  $2F_o - F_c$  omit map (Fig. 2c) shows a

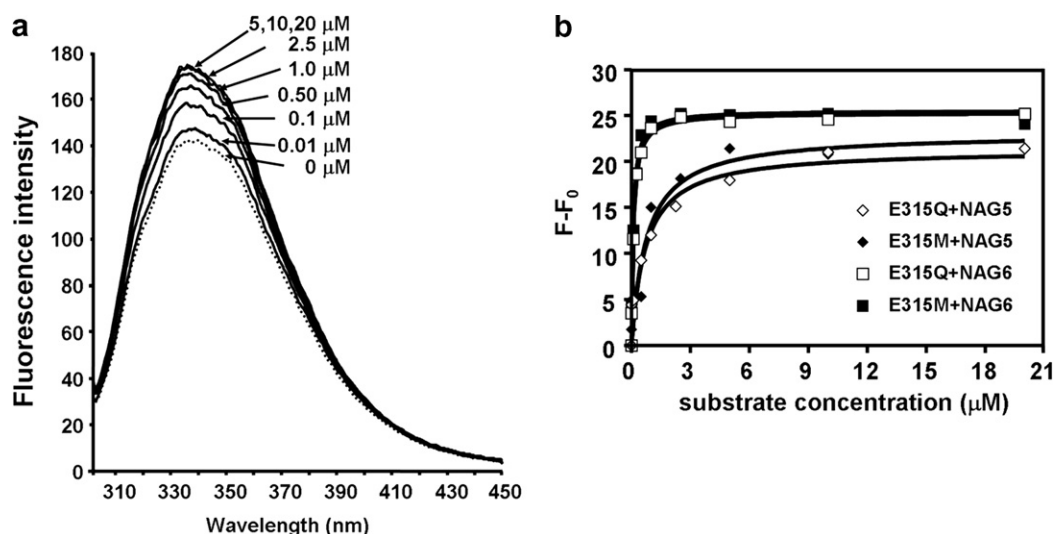
full span of NAG6 through the –4 to +2 subsites and a twist of the glycosidic bond between –1NAG and +1NAG (rather than between –3NAG and –2NAG as observed for NAG5) (Fig. 2b). As a result, the planes of the reducing-end disaccharide (+1NAG and +2NAG) are rotated by 90 degrees from the original plane. Additionally, the NAG6 units assume a ‘bent’ conformation due to geometric constraints at the –1 site causing the sugar (–1NAG) unit to be pulled down by 4.45 Å. This bending event probably takes place as an outcome of the sliding of the sugar chain towards the immobilized reducing-end subsites, enabling the non-reducing-end unit to interact at subsite –4. This process most likely occurs through swapping hydrogen bonds to allow the orientations of the sugars to be maintained while introducing the kink into the backbone (compare Fig 2a to b). For much longer oligosaccharides the flexibility of ChBD with respect to the catalytic domain may aid this sliding mechanism, as illustrated in Fig. 1c.

The binding characteristics of E315M to NAG5 and NAG6 were studied by the fluorescence spectroscopy. Excitation at 295 nm produced ligand-dependent changes in fluorescence intensity at the maximum emission wavelength of 338 nm. The wavelength of this maximum was not altered by the presence of NAG5 or NAG6. The fluorescence intensities were found to be substrate concentration dependent and saturable, which typically represents ligand binding to the proteins (Fig. 4a). The fluorescence intensity data were fitted reasonably well into the single-site-binding model of a non-linear regression function (Fig. 4b). The estimated  $K_d$  values of mutant E315M and E315Q against NAG5 ( $0.72 \pm 0.24$  and  $0.76 \pm 0.23$   $\mu$ M) and NAG6 ( $0.09 \pm 0.01$  and  $0.10 \pm 0.01$   $\mu$ M) are found to be indistinguishable. This provides evidence that the different conformations of NAG5 and NAG6 detected in the active site of E315M (Fig. 2a and b) were not structural artifact due to increased hydrophobicity arising from the methionine substitution of Glu315. The  $K_d$  values of E315M/Q against NAG5 are estimated to be eight times higher than the values against NAG6. These values are a reflection of the fewer interactions of the linear NAG5, which we suggest represents the recognition conformation of an oligosaccharide. Sliding and bending of the oligosaccharide into the NAG6 conformation would result in an increase in the number of interactions and is consistent with a slower off rate contributing to an overall higher affinity.

### 3.4. Proposed catalytic mechanism

Inspection of the final  $2F_o - F_c$  omit map of E315M+NAG6 shows good density throughout the NAG6 chain. However, there remains unexplained density unaccounted for by the NAG6 model. Comparison with the NAG5 structure suggests a lower occupancy conformation of the NAG6 in which the sugar follows the path of the NAG5 sugar (see Fig. 2c). Hence, NAG6 appears to adopt two conformations in binding to the mutant E315M, the major form being bent and the minor form linear.





**Fig. 4.** Protein-ligand binding studies by fluorescence spectroscopy. (a) Effects of NAG<sub>6</sub> on the intrinsic fluorescence of E315M. Increased amounts of NAG<sub>6</sub> were added to 0.25  $\mu$ M of the purified protein in 20 mM Tris-HCl (pH 8.0). The emission spectra were collected from 300–450 nm upon excitation of 295 nm. (b) The binding curves determined for NAG5 and NAG6 binding to mutants E315Q and E315M. Relative fluorescence intensity data ( $F - F_0$ ) at 338 nm were fitted to a single-binding site model (see texts).

The distortion of –1NAG into a boat conformation and the twist of the scissile bond were predicted using molecular dynamics simulations (Brameld and Goddard, 1998a) and were verified by the crystal structures of *S. marcescens* chitinase, hevamine, or *S. marcescens* ChiA (Aronson et al., 2003; Papanikolaou et al., 2001; Terwisscha van Scheltinga et al., 1994; Tews et al., 1996; Tews et al., 1997). However, the partial density of the linear conformation in the electron density of NAG6 in E315M+NAG6 is the first crystallographic evidence for the occurrence of a recognition conformation that proceeds through a directed structural change to the catalytic conformation. Taking all the data obtained in this study together, *V. harveyi* chitinase A is presumed to catalyse the substrate hydrolysis following the ‘slide and bend mechanism’ as previously suggested for a long chain substrate (Watanabe et al., 2003). The proposed mechanism has four steps as shown in Fig. 5.

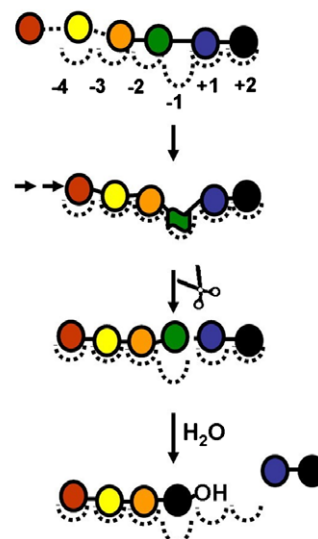
## Steps

### 1. Substrate recognition

### 2. Sliding and bending

### 3. Bond cleavage

### 4. Product release



**Fig. 5.** The proposed catalytic mechanism of *V. carchariae* chitinase A. GlcNAc units are shown as filled, coloured circles. The reducing-end sugar is in black. Broken lines joining sugar rings represent free glycosidic bonds, solid lines depict constrained bonds. Curved dashed lines free the binding subsites to the protein. Arrows signify the sliding of the sugar chain to allow the binding of the non-reducing end sugars (–4NAG) and for the green GlcNAc unit to adopt a boat conformation. (For interpretation of color mentioned in this figure the reader is referred to the web version of the article.)

## 4. Conclusions

This paper describes four crystal structures of *V. harveyi* chitinases A that have been solved to maximum resolution of 2.0–1.7 Å. The overall structure of chitinase A comprises three domains, which closely resembles chitinase A from *S. marcescens*. The structure of the ligand-free inactive mutant E315M displays blockage of the substrate-binding cleft by the C-terminal His6 residues from a second molecule. The structures of E315M bound to NAG5 and NAG6 provide key evidence that the interacting sugar undergoes conformational change to facilitate hydrolysis. Taking

- Step 1. **Substrate recognition:** A linear form of chitooligosaccharide enters the substrate-binding cleft and its reducing end (dark filled circle) is primarily recognised by the +2 binding residues, such as Trp275, Asp392, Trp397, and Tyr435 (Table 2).
- Step 2. **Sliding and bending:** The sugar chain slides forward towards the reducing end distorting the chain especially in –1 NAG (green filled circle) and causing it to bend and take up a transient strained (boat) conformation. The increase in protein-sugar contacts in this conformation particularly in binding at the non-reducing end –4 site and at the catalytic site may drive this conformational change. Longer chitooligosaccharides may be aided in this movement by the flexibility in the ChBD relative to the catalytic domain.
- Step 3. **Bond cleavage:** The twist of the scissile bond, together with the bending of –1NAG, renders the linking glycosidic oxygen accessible to the catalytic residue Glu315 for cleavage. The stereoselective attack of the reaction intermediate (oxazolinium ion) by a neighbouring water leads to a retention of configuration of the anomeric product (Papanikolaou et al., 2001; Terwisscha van Scheltinga et al., 1994; Tews et al., 1997).
- Step 4. **Product release:** The cleaved components have lower binding energy, permitting the oligosaccharide (mainly NAG2, dark- and blue- filled circles) at the product side to diffuse away.

all the data together, we propose that the *V. harveyi* chitinase A catalyses the hydrolytic reaction through a “slide and bend” mechanism.

## Acknowledgments

This work is financially supported by The Thailand Research Fund (TRF) and The Thai Commission on Higher Education through Research Career Development Grant (RMU4980028), and the National Synchrotron Research Centre (NSRC), Thailand. R.C.R. and A.H.A. thank the Institute of Molecular and Cell Biology, Biopolis, Singapore and A\*STAR, Singapore for their support.

## References

- Armand, S., Tomita, H., Heyraud, A., Gey, C., Watanabe, T., Henrissat, B., 1994. Stereochemical course of the hydrolysis reaction catalysed by chitinases A1 and D from *Bacillus circulans* WL-12. *FEBS Lett.* 343, 177–180.
- Aronson Jr., N.N., Halloran, B.A., Alexyev, M.F., Amable, L., Madura, J.D., Pasupulati, L., Worth, C., van Roey, P., 2003. Family 18 chitinase-oligosaccharide substrate interaction: subsite preference and anomer selectivity of *Serratia marcescens* chitinase A. *Biochem. J.* 376, 87–95.
- Bhattacharya, D., Nagpure, A., Gupta, R.K., 2007. Bacterial chitinases: properties and potential. *Crit. Rev. Biotechnol.* 27, 21–28.
- Brameld, K.A., Goddard III, W.A., 1998a. Substrate distortion to a boat conformation at subsite –1 is critical in the mechanism of family 18 chitinases. *J. Am. Chem. Soc.* 120, 3571–3580.
- Brameld, K.A., Goddard III, W.A., 1998b. The role of enzyme distortion in the single displacement mechanism of family 19 chitinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 4276–4281.
- Bruce, A., Srinivasan, U., Staines, H.J., Highley, T.L., 1995. Chitinase and laminarinase production in liquid culture by *Trichoderma* spp. and their role in biocontrol of wood decay fungi. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 35, 337–353.
- Collaborative Computational Project, Number 4., 1994. The CCP4 suit: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr. D50*, 760–763.
- Srivastava, D.B., Ethayathulla, A.S., Kumar, J., Singh, N., Sharma, S., Das, U., Srinivasan, A., Singh, T.R., 2006. Crystal structure of a secretory signalling glycoprotein from sheep at 2.0 Å resolution. *J. Struct. Biol.* 156, 505–516.
- Donnelly, L.E., Barnes, P.J., 2004. Acidic mammalian chitinase—a potential target for asthma therapy. *Trends Pharmacol. Sci.* 25, 509–511.
- Fukamizo, T., 2000. Chitinolytic enzymes: catalysis, substrate binding, and their application. *Curr. Protein Pept. Sci.* 1, 105–124.
- Fukamizo, T., Sasaki, C., Schelp, E., Bortone, K., Robertus, J.D., 2001. Kinetic properties of chitinase-1 from the fungal pathogen *Coccidioides immitis*. *Biochemistry* 40, 2448–2454.
- Fusetti, F., von Moeller, H., Houston, D., Rozeboom, H.J., Dijkstra, B.W., Boot, R.G., Aerts, J.M., van Aalten, D.M., 2002. Structure of human chitotriosidase. Implications for specific inhibitor design and function of mammalian chitinase-like lectins. *J. Biol. Chem.* 277, 25537–25544.
- Hart, P.J., Pfluger, H.D., Monzingo, A.F., Hollis, T., Robertus, J.D., 1995. The refined crystal structure of an endochitinase from *Hordeum vulgare* L. seeds at 1.8 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 248, 402–413.
- Hollis, T., Monzingo, A.F., Bortone, K., Ernst, S., Cox, R., Robertus, J.D., 2000. The X-ray structure of a chitinase from the pathogenic fungus *Coccidioides immitis*. *Protein Sci.* 9, 544–551.
- Honda, Y., Kitaoka, M., Hayashi, K., 2004. Kinetic evidence related to substrate-assisted catalysis of family 18 chitinases. *FEBS Lett.* 567, 307–310.
- Jeuniaux, C., 1961. Chitinase an addition to the list of hydrolases in the digestive tract of vertebrates. *Nature* 192, 135–136.
- Jones, T.A., Zou, J.Y., Cowan, S.W., Kjeldgaard, M., 1991. Improved methods for building models in electron density maps and the location of errors in these models. *Acta Crystallogr. A47*, 110–119.
- Kawada, M., Hachiya, Y., Arihiro, A., Mizoguchi, E., 2007. Role of mammalian chitinases in inflammatory conditions. *Keio J. Med.* 56, 21–27.
- Keyhani, N.O., Roseman, S., 1999. Physiological aspects of chitin catabolism in marine bacteria. *Biochim. Biophys. Acta* 1473, 108–122.
- Kuranda, M.J., Robbins, P.W., 1991. Chitinase is required for cell separation during growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 266, 19758–19767.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Laskowski, R.A., MacArthur, M.W., Moss, D.S., Thornton, J.M., 1993. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Crystallogr.* 26, 283–291.
- Leah, R., Tommerup, H., Svendsen, I., Mundy, J., 1991. Biochemical and molecular characterization of three anti-fungal proteins from barley seed. *J. Biol. Chem.* 266, 1564–1573.
- Leslie, A.G.W., 1991. Recent changes to the MOSFLM package for processing film and image plate data. CCP4 and ESRF-EACMB. Newsletters on Protein Crystallography. SERC Laboratory, Daresbury, Warrington, WA44AD, UK.
- Li, Q., Wang, F., Zhou, Y., Xiao, X., 2005. Putative exposed aromatic and hydroxyl residues on the surface of the N-terminal domains of Chi1 from *Aeromonas caviae* CB101 are essential for chitin binding and hydrolysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 7559–7561.
- Matsumoto, T., Nonaka, T., Hashimoto, M., Watanabe, T., Mitsui, Y., 1999. Three dimensional structure of the catalytic domain of chitinase A1 from *Bacillus circulans* WL-12 at a very high resolution. *Proc. Jpn. Acad.* 75, 269–274.
- Murshudov, G.N., Vagin, A.A., Dodson, E.J., 1997. Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr. D53*, 240–255.
- Navaza, J., 1994. AmoRe: an automated package for molecular replacement. *Acta Crystallogr. Sect. A50*, 157–163.
- Pantoom, S., Songsiriritthigul, C., Suginta, W., 2008. The effects of the surface-exposed residues on the binding and hydrolytic activities of *Vibrio carchariae* chitinase A. *BMC Biochem.* 9 (2).
- Papanikolaou, Y., Prag, G., Tavlas, G., Vorgias, C.E., Oppenheim, A.B., Petratos, K., 2001. High resolution structural analyses of mutant chitinase A complexes with substrates provide new insight into the mechanism of catalysis. *Biochemistry* 40, 11338–11343.
- Pedersen, K., Verdonck, L., Austin, B., Austin, D.A., Blanch, A.R., Grimont, P.A.D., Jofre, J., Koblavi, S., Larsen (IVP), J.L., Tiainen, T., Vigneulle, M., Swings, J., 1998. Taxonomic evidence that *Vibrio carchariae* Grimes et al. 1985 is a junior synonym of *Vibrio harveyi* (Johnson and Shunk 1936) Baumann et al. 1981. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48, 749–758.
- Perrakis, A., Tews, I., Dauter, Z., Oppenheim, A.B., Chet, I., Wilson, K.S., Vorgias, C.E., 1994. Crystal structure of a bacterial chitinase at 2.3 Å resolution. *Structure* 2, 1169–1180.
- Robbins, P.W., Albright, C., Benfield, B., 1988. Cloning and expression of a *Streptomyces plicatus* chitinase (chitinase-63) in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 263, 443–447.
- Sahai, A.S., Manocha, M.S., 1993. Chitinases of fungi and plants: their involvement in morphogenesis and host–parasite interaction. *FEMS Microbiol.* 11, 317–338.
- Sasaki, C., Yokoyama, A., Itoh, Y., Hashimoto, M., Watanabe, T., Fukamizo, T., 2002. Comparative study of the reaction mechanism of family 18 chitinases from plants and microbes. *J. Biochem. (Tokyo)* 131, 557–564.
- Suginta, W., Robertson, P.A., Austin, B., Fry, S.C., Fothergill-Gilmore, L.A., 2000. Chitinases from *Vibrio*: activity screening and purification of chiA from *Vibrio carchariae*. *J. Appl. Microbiol.* 89, 76–84.
- Suginta, W., Vongsuwan, A., Songsiriritthigul, C., Prinz, H., Estibeiro, P., Duncan, R.R., Svasti, J., Fothergill-Gilmore, L.A., 2004. An endochitinase A from *Vibrio carchariae*: cloning, expression, mass and sequence analyses, and chitin hydrolysis. *Arch. Biochem. Biophys.* 424, 171–180.
- Suginta, W., Vongsuwan, A., Songsiriritthigul, C., Svasti, J., Prinz, H., 2005. Enzymatic properties of wild-type and active site mutants of chitinase A from *Vibrio carchariae*, as revealed by HPLC-MS. *FEBS J.* 272, 3376–3386.
- Suginta, W., Songsiriritthigul, C., Kobdaj, A., Opasiri, R., Svasti, J., 2007. Mutations of Trp275 and Trp397 altered the binding selectivity of *Vibrio carchariae* chitinase A. *Biochim. Biophys. Acta* 1770, 1151–1160.
- Suzuki, K., Taiyogi, M., Sugawara, N., Nikaidou, N., Henrissat, B., Watanabe, T., 1999. The third chitinase gene (chiC) of *Serratia marcescens* 2170 and the relationship of its product to other bacterial chitinases. *Biochem. J.* 343, 587–596.
- Terwisscha van Scheltinga, A.C., Kalk, K.H., Beintema, J.J., Dijkstra, B.W., 1994. Crystal structures of hevamine, a plant defence protein with chitinase and lysozyme activity, and its complex with an inhibitor. *Structure* 2, 1181–1189.
- Terwisscha van Scheltinga, A.C., Armand, S., Kalk, K.H., Isogai, A., Henrissat, B., Dijkstra, B.W., 1995. Stereochemistry of chitin hydrolysis by a plant chitinase/lysozyme and X-ray structure of a complex with allosamidin: evidence for substrate assisted catalysis. *Biochemistry* 34, 15619–15623.
- Terwisscha van Scheltinga, A.C., Hennig, M., Dijkstra, B.W., 1996. The 1.8 Å resolution structure of hevamine, a plant chitinase/lysozyme, and analysis of the conserved sequence and structure motifs of glycosyl hydrolase family 18. *J. Mol. Biol.* 262, 243–257.
- Tews, I., Perrakis, A., Oppenheim, A., Dauter, Z., Wilson, K.S., Vorgias, C.E., 1996. Bacterial chitobiase structure provides insight into catalytic mechanism and the basis of Tay-Sachs disease. *Nat. Struct. Biol.* 3, 638–648.
- Tews, I., Terwisscha van Scheltinga, A.C., Perrakis, A., Wilson, K.S., Dijkstra, B.W., 1997. Substrate-assisted catalysis unifies two families of chitinolytic enzymes. *J. Am. Chem. Soc.* 119, 7954–7959.
- Uchiyama, T., Katouno, F., Nikaidou, N., Nonaka, T., Sugiyama, J., Watanabe, T., 2001. Roles of the exposed aromatic residues in crystalline chitin hydrolysis by chitinase A from *Serratia marcescens* 2170. *J. Biol. Chem.* 276, 41343–41349.
- Van Aalten, D.M., Synstad, B., Brurberg, M.B., Hough, E., Riise, B.W., Eijssink, V.G., Wierenga, R.K., 2000. Structure of a two-domain chitotriosidase from *Serratia marcescens* at 1.9-Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 5842–5847.
- Van Aalten, D.M., Komander, D., Synstad, B., Gaseidnes, S., Peter, M.G., Eijssink, V.G., 2001. Structural insights into the catalytic mechanism of a family 18 exo-chitinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 8979–8984.
- Watanabe, T., Ishibashi, A., Ariga, Y., Hashimoto, M., Nikaidou, N., Sugiyama, J., Matsumoto, T., Nonaka, T., 2001. Trp122 and Trp134 on the surface of the catalytic domain are essential for crystalline chitin hydrolysis by *Bacillus circulans* chitinase A1. *FEBS Lett.* 494, 74–78.
- Watanabe, T., Ariga, Y., Sato, U., Toratani, T., Hashimoto, M., Nikaidou, N., Kezuka, Y., Nonaka, T., Sugiyama, J., 2003. Aromatic residues within the substrate-binding cleft of *Bacillus Circulans* chitinase A1 are essential for hydrolysis of crystalline chitin. *Biochem. J.* 376, 237–244.



# Substrate binding modes and anomer selectivity of chitinase A from *Vibrio harveyi*

Wipa Suginta · Supansa Pantoom · Heino Prinz

Received: 26 February 2009 / Accepted: 7 May 2009  
© Springer-Verlag 2009

**Abstract** High-performance liquid chromatography mass spectrometry (HPLC MS) was employed to assess the binding behaviors of various substrates to *Vibrio harveyi* chitinase A. Quantitative analysis revealed that hexaNAG preferred subsites −2 to +2 over subsites −3 to +2 and pentaNAG only required subsites −2 to +2, while subsites −4 to +2 were not used at all by both substrates. The results suggested that binding of the chitooligosaccharides to the enzyme essentially occurred in compulsory fashion. The symmetrical binding mode (−2 to +2) was favored presumably to allow the natural form of sugars to be utilized effectively. Crystalline  $\alpha$  chitin was initially hydrolyzed into a diverse ensemble of chitin oligomers, providing a clear sign of random attacks that took place within chitin chains. However, the progressive degradation was shown to occur in greater extent at later time to complete hydrolysis. The effect of the reducing-end residues were also investigated by means of HPLC MS. Substitutions of Trp275 to Gly and Trp397 to Phe significantly shifted the anomer selectivity of the enzyme toward  $\beta$  substrates. The Trp275 mutation modulated the kinetic property of the enzyme by decreasing the catalytic constant ( $k_{\text{cat}}$ ) and the substrate specificity ( $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ ) toward all substrates by five- to tenfold. In contrast, the Trp397

mutation weakened the binding strength at subsite (+2), thereby speeding up the rate of the enzymatic cleavage toward soluble substrates but slowing down the rate of the progressive degradation toward insoluble chitin.

**Keywords** Chitin · Substrate binding mode · HPLC MS · *Vibrio harveyi* · Family-18 chitinase · Active-site mutation

## Abbreviations

NAG <sub>n</sub>	$\beta$ -1-4 linked oligomers of <i>N</i> -acetylglucosamine residues where $n=1-6$
DNS	Dinitrosalicylic acid
IPTG	Isopropyl thio- $\beta$ -D-galactoside
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluoride
HPLC ESI-MS	High-performance liquid chromatography electrospray mass spectrometry
ChBD	Chitin-binding domain

## Introduction

Chitin is a homopolymer composed of  $\beta$ -(1,4)-linked *N*-acetylglucosamine (GlcNAc or NAG) units and is mainly found as a structural component of fungal cell walls and exoskeletons of crustaceans and insects. A complete degradation of chitin requires chitinases (EC 3.2.1.14) and *N*-acetyl- $\beta$ -glucosaminidases (EC 3.2.1.52). Chitinases are found in various organisms, and their physiological functions are dependent on the structural roles of chitin substrates existing in different species. Degradation of chitin by marine bacteria [1, 2] is crucial for maintaining the ecosystem in the marine environment [3]. In insects, chitinases are essential in the molting process and may also affect gut physiology through their involvement

W. Suginta (✉) · S. Pantoom  
Biochemistry–Electrochemistry Research Unit,  
School of Chemistry and Biochemistry, Institute of Science,  
Suranaree University of Technology,  
Nakhon, Ratchasima 30000, Thailand  
e-mail: wipa@sut.ac.th

H. Prinz  
The Max-Planck Institute of Molecular Physiology,  
Otto-Hahn-Strasse 11,  
44227 Dortmund, Germany

in peritrophic membrane turnover [4]. Plants produce chitinases as part of their defense mechanism against distinct pathogens [5, 6], whereas fungal chitinases participate in a number of morphogenetic processes, including spore germination, side-branch formation, differentiation into spores, and autolysis [7]. Human chitinases are involved in asthma and inflammatory conditions, but the endogenous substrate(s) and the pathogenic mechanism is not yet known [8–10].

Different bacteria seem to secrete different forms of chitinases [2, 11–17]. For example, *Serratia marcescens* produces three chitinases: ChiA, ChiB, and ChiC for a synergistic degradation of chitin [18, 19], whereas *Vibrio harveyi* (formerly *Vibrio carchariae*) mainly expresses chitinase A [2]. In the CAZy database (<http://www.cazy.org>), *V. harveyi* chitinase A is classified as a member of family-18 glycosyl hydrolases, comprising a ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub>-barrel catalytic domain with a deep substrate-binding cleft and is known to catalyze the hydrolytic reaction through the ‘substrate-assisted’ or ‘retaining mechanism’ [20–26]. Most recently, the crystal structures of *V. harveyi* chitinase and its mutant E315M complexed with NAG<sub>5</sub> and NAG<sub>6</sub> were reported at 1.8–2.1 Å resolutions [27]. The structures revealed that chitooligosaccharides most likely interact with the multiple subsites of the enzyme using a linear conformation. Subsequently, the sugar chain develops a ‘kink’ conformation to facilitate bond cleavage. Such a movement is presumed to proceed via the ‘slide and bend’ mechanism [27]. The sliding motion of a chitooligomer resembles the feeding mechanism proposed by Watanabe and co-workers [28] for long-chain chitin. Either sliding or feeding, the process could be achieved only when a chitinase exhibits high processivity toward its substrates. The processivity has been described previously for other polysaccharide degrading enzymes, such as Chi A from *S. marcescens* [19, 28–30], cellobiohydrolases Cel6A from *Humicola insolens* [31], and Cel7A from *Trichoderma reesei* [32].

Insoluble substrates have been proposed to enter the active site of chitinases by the feeding mechanism and chitin oligomers by a random mechanism [28, 33]. Such a hypothesis probably holds true for most of the cases. However, a major point of concern remains the random cleavage of a chitin polymer by an endo action of chitinase A. We previously verified that *V. harveyi* chitinase A initially degraded insoluble chitins into NAG<sub>2–6</sub> [20, 34]. Indeed, the production of the chitin oligomers other than NAG<sub>2</sub> cannot be explained as an outcome of the feeding mechanism. This is because the sliding following progressive degradation of chitin will only give rise to a single species of the product (NAG<sub>2</sub>). In this study, we employed quantitative HPLC-MS as a direct and sensitive tool to investigate the binding behaviors of three different sub-

strates. Together with kinetic analysis, we also demonstrated that point mutation of the reducing-end binding residues (Trp275 and Trp397) affected the substrate specificity of the tested substrates and significantly altered the anomer selectivity of *V. harveyi* chitinase A. This enzyme belongs to family-18 chitinases, which are potential drug targets for the treatment of allergic asthma.

## Experimental

### Bacterial strains and chemicals

The pQE 60 expression vector harboring the DNA fragment that encodes chitinase A (amino acid residues 22–597, without the 598–850 C-terminal fragment) and *Escherichia coli* type strain M15 (Qiagen, Valencia, CA, USA) were used for a high-level expression of recombinant chitinases. Chitooligosaccharides were obtained from Seikagaku Corporation (Bioactive Co., Ltd., Bangkok, Thailand). Flake chitin from crab shells was the product of Sigma-Aldrich Pte Ltd. (The Capricorn, Singapore Science Park II, Singapore). Other chemicals and reagents (analytical grade) were obtained from the following sources: reagents for bacterial media (Scharlau Chemie S.A., Barcelona, Spain.); all chemicals for protein preparation (Sigma-Aldrich Pte Ltd., Singapore and Carlo Erba Reagenti SpA, Limito, Italy); and reagents for HPLC-MS measurements (J.T. Baker, Deventer, Holland and LGC Promochem GmbH, Wesel, Germany). Milli-Q water was used for preparations of reaction buffers and for HPLC MS measurements.

### Instrumentation

HPLC was operated on a 150×2.1 mm 5 μm Hypercarb® column (ThermoQuest, Thermo Electron Corporation, San Jose, CA, USA) connected to an Agilent Technologies 1100 series HPLC system (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) under the control of a Thermo Finnigan LTQ electrospray mass spectrometer. The proprietary program Xcalibur (Thermo Finnigan, Thermo Electron Corporation, San Jose, CA, USA) was used to control and calibrate HPLC ESI/MS. For partial hydrolysis of colloidal chitin, the electrospray MS was conducted under a positive full scan mode with a range of the mass/charge ratio ( $m/z$ ) of 200–1,400. Later, the HPLC MS was run under the single ion monitoring mode for improvement of signal/noise ratios. The selected masses for detection were  $m/z$  424.5 for NAG<sub>2</sub>,  $m/z$  627.5 for NAG<sub>3</sub>,  $m/z$  830.3 for NAG<sub>4</sub>,  $m/z$  1034.16 for NAG<sub>5</sub>, and  $m/z$  1236.3 for NAG<sub>6</sub>. The UV signals were detected by a diode array detector between 200 and 400 nm.

### Site directed mutagenesis

Point mutations were introduced to the wild-type *chitinase A* DNA that was previously cloned into the pQE60 expression vector by polymerase chain reaction (PCR) technique [20], using the QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit. Mutations of Trp275 to Gly and Trp397 to Phe (so as to create mutants W275G and W397F, respectively) were generated using oligonucleotides synthesized from BioServiceUnit (BSU) (Bangkok, Thailand). The forward oligonucleotide sequence used for mutagenesis of Trp275 to Gly is 5'-CATCTATCGGTGGTGGAA-CACCTTCTGAC-3' and the reverse sequence is 5'-GTCA-GAAAGTGTTCCACCACCGATAGATG-3'. For mutagenesis of Trp397 to Phe, the forward sequence is 5'-GACTTCTACGGCGGCTTCAACAACGTTCC-3' and the reverse sequence is 5'-GGAACGTTGTTGAAGCCGCCGTAGAAGTC-3'. Sequences underlined represent the mutated codons. The success of point mutations was confirmed by automated DNA sequencing (BSU, Thailand).

### Recombinant expression and purification

The wild-type chitinase A with a C-terminal hexahistidine sequence was highly expressed in *E. coli* M15 cells [20]. Chitinase A mutants W275G and W397F were obtained by PCR-based site directed mutagenesis as described by Suginta et al. [35]. For recombinant expression and purification, the freshly transformed cells were grown at 37 °C in 500 mL of Luria–Bertani medium containing 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  ampicillin until OD<sub>600</sub> reached 0.6. Then, the chitinase production was induced by the addition of 0.5 mM IPTG at 25 °C for 18 h. The cell pellet was harvested by centrifugation, re-suspended in 40 mL of lysis buffer (20 mM Tris/HCl buffer, pH 8.0, containing 150 mM NaCl, 1 mM PMSF, and 1  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  lysozyme), and then lysed on ice using a Sonopuls Ultrasonic homogenizer with a 6-mm-diameter probe. The supernatant obtained after centrifugation at 12,000 $\times g$ , 45 min was applied to a Ni-NTA agarose affinity column (1.0 $\times$ 10 cm) (Qiagen GmbH, Hilden, Germany), washed thoroughly with 5 mM imidazole, then eluted with 250 mM imidazole in 20 mM Tris/HCl buffer, pH 8.0. An eluted fraction (10 mL) was subjected to several rounds of membrane centrifugation using Vivaspinn-20 ultrafiltration membrane concentrators ( $M_r$  10,000 cut-off, Vivascience AG, Hannover, Germany) for a complete removal of imidazole and for concentrating the proteins. Protein purity was verified on sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis as described by Laemmli [36]. A final concentration of the protein was determined by Bradford's method [37] using a standard calibration curve of bovine serum albumin (0–25  $\mu\text{g}$ ). The

freshly prepared proteins were subjected to functional characterization or stored at  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### Partial hydrolysis of chitoooligosaccharides by *V. harveyi* chitinase A

Partial hydrolysis of chitoooligosaccharides by wild-type was carried out in a 50- $\mu\text{L}$  reaction mixture, containing 0.1 M ammonium acetate buffer, pH 7.0, 500  $\mu\text{M}$  substrate, and 100 ng purified enzyme. To minimize isomerization of the anomeric products, the reaction was performed on ice (0 °C) for 3 min, and then a 10- $\mu\text{L}$  aliquot was transferred to a 200- $\mu\text{L}$  sample vial and immediately subjected to HPLC MS analysis. The sample tray was kept at 4 °C, and the column was operated at 10 °C. A constant flow rate of 0.4  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$  was applied with a run time set to 15 min using a 5–70% gradient of acetonitrile, containing 0.1% formic acid. The  $\beta/\alpha$  ratios were calculated from the peak areas of the corresponding products using the program Xcalibur and applying an MS Genesis algorithm for peak detection.

### Time courses of chitin hydrolysis

Time-course experiments were carried out on ice in a 100- $\mu\text{L}$  reaction mixture, containing 0.1 M ammonium acetate buffer, pH 7.0, 10% (w/v) crystalline  $\alpha$  chitin, and 50 ng purified enzyme. Aliquots of 10  $\mu\text{L}$  were taken at 0, 3, 7, 20, 30, 60, and 180 min and analyzed immediately by HPLC MS as described for chitin oligosaccharides. The peak areas, which represent total ion counts of the hydrolytic products, were quantified using the program Xcalibur applying a MS Avalon algorithm for peak detection. Standard calibration curves of NAG moieties were constructed separately from a mixture of oligosaccharide containing 0.2–500  $\mu\text{M}$  of NAG<sub>1–6</sub>. These data points yielded a linear curve of each standard sugar with the  $R^2$  values of 0.9995–1.0, thus allowing molar concentrations of chitoooligosaccharides to be determined with confidence. For the determination of  $\beta/\alpha$  contents of the chitoooligosaccharide products, the reaction mixture, containing 250 ng purified enzyme in 0.1 M ammonium acetate buffer, pH 7.0, was incubated with 500  $\mu\text{M}$  NAG<sub>5</sub> or NAG<sub>6</sub>. Aliquots of a 100- $\mu\text{L}$  reaction mixture were taken at specified times and analyzed immediately by HPLC MS. Amounts of  $\beta$  and  $\alpha$  anomers of the hydrolytic products were derived from the corresponding peak areas using the standard calibration curves constructed as mentioned above.

### Steady-state kinetics

Kinetic measurements were determined in a microtiter plate using NAG<sub>5</sub>, NAG<sub>6</sub>, and colloidal chitin as substrates. A

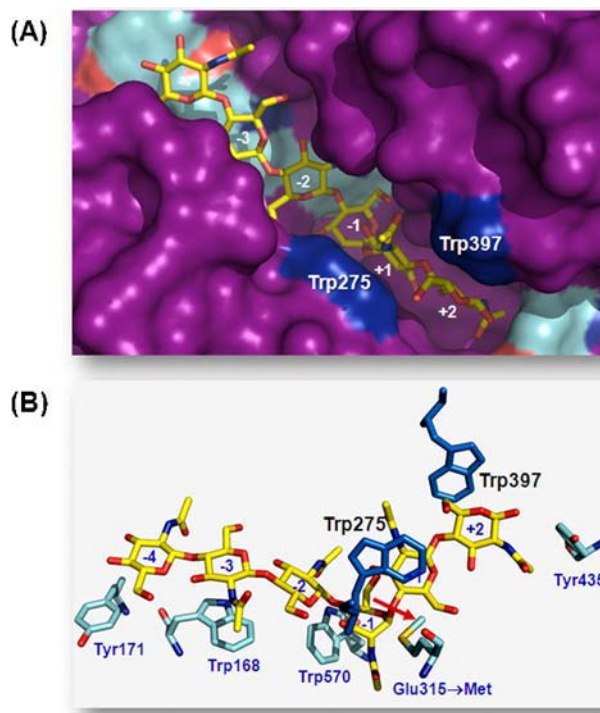
reaction mixture (100  $\mu$ L), containing 0–500  $\mu$ M substrate and chitinase (50  $\mu$ g wild type, 250  $\mu$ g W275G, or 0.4  $\mu$ g W397F) in 0.1 M sodium acetate buffer, pH 5.5 was incubated at 37  $^{\circ}$ C for 15 min. After boiling to 100  $^{\circ}$ C for 3 min, the entire reaction mixture was subjected to the reducing sugar assay using dinitrosalicylic acid (DNS) reagent as described by Miller [38]. For colloidal chitin, the reaction was carried out the same way as the reducing-sugar assay, but concentrations of colloidal chitin was varied from 0% to 5% (w/v) and amount of enzyme was used at 150  $\mu$ g wild type, 700  $\mu$ g W275G, or 200  $\mu$ g W397F. The amounts of the reaction products were determined from a standard curve of NAG<sub>2</sub> (0–500 nmol). The kinetic values were evaluated from three independent sets of data using the nonlinear regression function available in GraphPad Prism version 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA).

## Results

### Structural evidence of hexaNAG in the catalytic cleft of *V. harveyi* chitinase A

We recently described four crystal structures of *V. harveyi* chitinase A and its catalytically inactive mutant E315M in complex with chitooligosaccharides (PDB codes 3BS8, 3B9A, 3B90, and 3B9E) [27]. Figure 1a is a surface representation of the catalytic domain of the mutant E315M, displaying six units of NAG (yellow) being embedded inside a long, deep-binding groove and interact specifically with various aromatic residues that stretch along the elongated cleft of the enzyme. Figure 1b represents a stick model underlying specific interactions between Tyr171 and –4NAG, Trp168 and –3 NAG, Trp275 and Trp570 and –1 to +1NAG, and Trp397 and Tyr435 with +2NAG. It is clear that the hydrophobic faces of the residues Trp275 and Trp397 stack against the heterocyclic rings of the reducing-end sugar units (+1 NAG and +2NAG; blue, Fig. 1a, b). We previously suggested that both residues are important for the primary interaction with soluble substrates [35]. We shall discuss later, in this study, that Trp275 and Trp397 are also crucial for the progressive degradation of insoluble chitin.

The structure in Fig. 1b also displays the cleavage site that is located between sites –1 and +1 (red arrow). Following the retaining mechanism, further cleavage would be expected to yield only  $\beta$ NAG<sub>4</sub> and  $\beta$ NAG<sub>2</sub>. The released NAG<sub>4</sub> had two fates. It may diffuse into the reaction mixture and then rebind or it may slide forward to accommodate the next cleavage if remained attached to the active site. On the other hand, NAG<sub>2</sub> would dissociate from the product side (+1 and +2) and serves as the end product of hydrolysis.

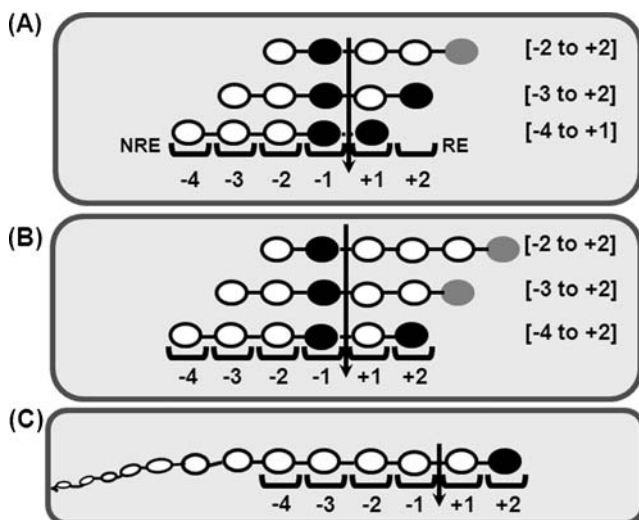


**Fig. 1** The active site of *V. harveyi* chitinase A mutant E315M bound to hexaNAG. **a** A surface representation of hexaNAG that fully occupied subsites –4 to +2 within the substrate binding cleft of the enzyme. The sugar rings of NAG<sub>6</sub> are shown in sticks. **b** A stick model of the binding cleft of chitinase A mutant E315M complexed with NAG<sub>6</sub>. N atoms are shown in blue and O atoms in red. C atoms are in marine blue for the amino acid residues and in yellow for the sugar residues. The cleavage site is indicated by an arrow, and Trp275 and Trp397 are represented in blue. The structure of E315M+NAG<sub>6</sub> complex is obtained from the PDB data base (PDB code, 3B9A) [24] and displayed by the program PyMol (<http://www.pymol.org/>)

### Investigation of the binding modes of soluble substrates

We employed quantitative HPLC MS to establish the binding modes of three substrates. Pursuing the idea of Uchiyama et al. [28] that chitooligosaccharides randomly enter the catalytic cleft of chitinase A, it is presumed that binding of the incoming sugar chain may begin at variable sites to allow various glycosidic bonds to be accessible to the cleavage site located between sites –1 to +1. Figure 2a and b represent three possibilities where soluble substrates could interact with the multiple binding subsites of the enzyme. For a NAG<sub>5</sub> substrate, the binding may begin at site –4 and end at site +1, leading to a complete formation of  $\beta$ NAG<sub>4</sub>+ $\beta$ NAG (Fig. 2a, bottom trace). Alternatively, the sugar chain may bind to subsites –3 to +2, subsequently generating  $\beta$ NAG<sub>3</sub>+ $\beta$ NAG<sub>2</sub> (Fig. 2a, middle trace) or only four units of NAG<sub>5</sub> bind to subsites –2 to +2, leaving the reducing-end NAG unbound at the exterior of the substrate binding cleft. As a result,  $\beta$ NAG<sub>2</sub> and either equilibrium ratio of  $\beta$ / $\alpha$ NAG<sub>3</sub> are expected (Fig. 2a, top trace).





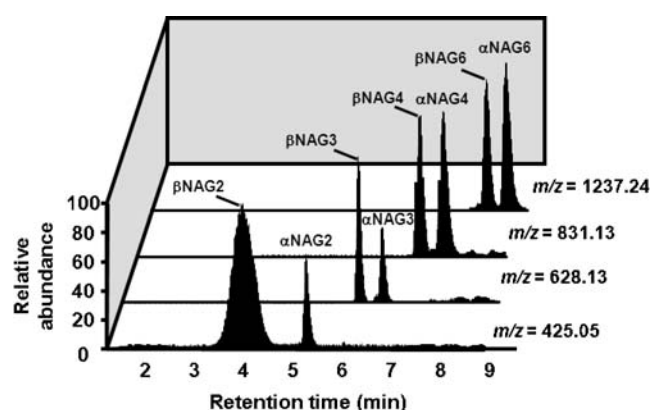
**Fig. 2** Three possible models of chitin oligosaccharide bindings to the multiple binding subsites of *V. harveyi* chitinase A. Hydrolysis of **a** NAG<sub>5</sub>, **b** NAG<sub>6</sub>, and **c** crystalline  $\alpha$  chitin. NAG unit with  $\beta$  configuration is shown in black circle, and NAG residue with  $\alpha$  or  $\beta$  configuration with an equilibrium ratio is shown in gray circle. Types of the reducing-end anomers are predicted based on the retaining mechanism as suggested for family-18 chitinases

With respect to a NAG<sub>6</sub> substrate, it could interact with subsites (-4 to +2). This binding mode is seen in the structure of E315M+NAG<sub>6</sub>, as shown in Fig. 1. The binding leads to a full occupancy of the six binding sites by chitohexaose (Fig. 2b, bottom trace). Subsequent bond cleavage results in the formation of  $\beta$ NAG<sub>4</sub>+ $\beta$ NAG<sub>2</sub>, where  $\beta$ NAG<sub>2</sub> is released from the reducing-end subsites +1 to +2. A different binding event takes place when five units of NAG<sub>6</sub> bind to positions (-3 to +2) (Fig. 2b, middle trace), leaving the reducing-end NAG lying empty beyond the substrate binding cleft. As a result, a single cleavage of NAG<sub>6</sub> leads to the formation of two NAG<sub>3</sub>, one of which (the non-reducing end NAG<sub>3</sub>) initially adopts  $\beta$  configuration, while the other NAG<sub>3</sub> possesses either  $\beta$  or  $\alpha$  configuration. A third version of binding is that four units of NAG<sub>6</sub> symmetrically interact with subsites (-2 to +2), thereby letting the reducing-end NAG<sub>2</sub> remain unbound (Fig. 2b, top trace). This (-2 to +2) binding mode releases  $\beta$ NAG<sub>2</sub> from subsites (-2 and -1), whereas  $\beta$  or  $\alpha$ NAG<sub>4</sub> is formed from the reducing-end side.

Assuming that the feeding mechanism is applicable, the binding characteristic of polymeric substrate is then depicted as Fig. 2c. After cleavage, a chitin chain remains attached to the active site before subsequently sliding forward toward the product side (+1 and +2), thereby allowing NAG<sub>2</sub> to be generated at a time. To investigate the preferred binding subsites of *V. harveyi* chitinase A, NAG<sub>5</sub> and NAG<sub>6</sub> (as a representative of soluble chitin) were partially hydrolyzed by the enzyme and the reaction mixtures analyzed immediately by HPLC MS. Partial

hydrolysis of the two substrates was carried out at 0 °C to stabilize the  $\beta$  and  $\alpha$  isomers of initial products. For the assignment of the HPLC elution of  $\alpha$  and  $\beta$  anomers acquired by our system, we referred to a separation profile of chitooligosaccharides obtained by reverse-phase HPLC and <sup>1</sup>H-NMR [39]. Figure 3 represents an HPLC MS separation of chitin intermediates derived from partial hydrolysis of NAG<sub>6</sub>. The  $\beta$  and  $\alpha$  forms of an individual sugar were eluted at different retention times as a doublet. The preceding peak of the doublet is identified as  $\beta$  and the following peak  $\alpha$ . Further mass detection by ESI-MS assigned  $m/z$  values of the two isomers of the same sugar to be identical. For instance,  $m/z$  424.5 was seen for  $\beta$  $\alpha$ NAG<sub>2</sub>, 627.5 for  $\beta$  $\alpha$ NAG<sub>3</sub>, 830.3 for  $\beta$  $\alpha$ NAG<sub>4</sub>, and 1,236.5 for  $\beta$  $\alpha$ NAG<sub>6</sub> (Fig. 3). Peak areas representing total ion counts of the corresponding oligomers were simply converted to molar concentrations using the standard calibration curves of NAG<sub>1–6</sub>.

From Fig. 3, *V. harveyi* chitinase A degraded NAG<sub>6</sub>, yielding  $\beta$ NAG<sub>2</sub>+ $\beta$ NAG<sub>3</sub> as major isomers. This action was observed as early as 3 min. On the other hand,  $\beta$ NAG<sub>4</sub> and  $\alpha$ NAG<sub>4</sub> were detected in comparable amounts, and NAG and NAG<sub>5</sub> were not observed at all (Fig. 3). With NAG<sub>5</sub> hydrolysis, two predominant products ( $\beta$ NAG<sub>2</sub>+ $\alpha$ NAG<sub>3</sub>) were captured during the initial time (data not shown). No other product was seen. The preferred binding modes of the enzyme toward NAG<sub>5</sub> and NAG<sub>6</sub> were determined by comparing  $\beta$  content to  $\alpha$  content of the same product (Table 1). The  $\beta$  contents of NAG<sub>2</sub>, NAG<sub>3</sub>, and NAG<sub>4</sub> obtained from NAG<sub>6</sub> hydrolysis were estimated as 90%, 65%, and 46%, respectively (Table 1, wild type). Such values do not at all fit with the  $\beta/\alpha$  ratios calculated by a single binding mode as presented in Fig. 2b. Apparently, the values agree well with the values (data in



**Fig. 3** An HPLC MS profile of the initial products obtained from partial hydrolysis of NAG<sub>6</sub> by wild-type chitinase A. The hydrolytic reaction (50  $\mu$ L) was carried out on ice to minimize the rate of mutarotation. After 3 min, aliquots of 10  $\mu$ L of the reaction mixture were subjected to HPLC MS analysis

**Table 1** Quantitative HPLC MS analysis of partial hydrolysis of chitooligosaccharides

Substrate	Enzyme	$\beta$ content of initial products					
		NAG <sub>1</sub>	NAG <sub>2</sub>	NAG <sub>3</sub>	NAG <sub>4</sub>	NAG <sub>5</sub>	NAG <sub>6</sub>
pentaNAG (NAG <sub>5</sub> )	Wild-type	n.d. <sup>a</sup>	90 $\pm$ 4.1(100) <sup>b</sup>	42 $\pm$ 2.3(42)	n.d.	–	–
	W275G	n.d.	93 $\pm$ 3.3	68 $\pm$ 9.2	n.d.	–	–
	W397F	81 $\pm$ 6.0	69 $\pm$ 1.6	98 $\pm$ 1.2	96 $\pm$ 1.5	–	–
hexaNAG (NAG <sub>6</sub> )	Wild type	n.d.	90 $\pm$ 2.2(100) <sup>c</sup>	65 $\pm$ 3.0(71)	46 $\pm$ 3.7(48)	–	–
	W275G	n.d.	92 $\pm$ 4.9	63 $\pm$ 0.7	79 $\pm$ 2.8	–	–
	W397F	n.s. <sup>d</sup>	66 $\pm$ 3.1	95 $\pm$ 9.5	91 $\pm$ 8.4	96 $\pm$ 1.8	–
Crystalline $\alpha$ chitin	Wild type	n.d.	87 $\pm$ 1.5(100) <sup>e</sup>	50 $\pm$ 1.3(n.d.)	42 $\pm$ 1.0(n.d)	37 $\pm$ 0.9(n.d.)	46 $\pm$ 4.5(n.d.)
	W275G	n.d.	88 $\pm$ 1.2	48 $\pm$ 2.2	56 $\pm$ 3.2	49 $\pm$ 5.8	50 $\pm$ 3.7
	W397F	n.s.	88 $\pm$ 2.1	46 $\pm$ 1.2	57 $\pm$ 3.4	57 $\pm$ 1.4	51 $\pm$ 2.0

A reaction mixture (50  $\mu$ L), containing chitin substrates and chitinase A in 0.1 M ammonium acetate buffer, pH 7.0, was incubated on ice and then analyzed by HPLC ESI/MS after 3 min. The  $\beta$  contents were deduced from the peak areas of the corresponding products.

<sup>a</sup> n.d. represents product is not detectable

<sup>b</sup> The values in brackets are the expected values from the  $-2$  to  $-2$  binding mode for NAG<sub>5</sub> hydrolysis

<sup>c</sup> The values in brackets are the expected values from a combination of the  $-3$  to  $+2$  and  $-2$  to  $+2$  modes for NAG<sub>6</sub> hydrolysis

<sup>d</sup> n.s. represents non-separable between  $\beta$  and  $\alpha$  anomer. The initial  $\beta$  contents were estimated from three independent sets of the experiment

<sup>e</sup> The value is predicted from the progressive degradation of insoluble chitin

brackets, Table 1) derived from a combination of the  $-2$  to  $+2$  and  $-3$  to  $+2$  binding modes (top and middle traces, Fig. 2b). For NAG<sub>5</sub> hydrolysis, the  $\beta$  contents of NAG<sub>2</sub> and NAG<sub>3</sub> products were predicted as 90% and 42%. These values are consistent with a single  $-2$  to  $+2$  binding mode (top trace, Fig. 2a). When the hydrolytic reactions were performed at equilibrium (25 °C, overnight), the predominating form of all the sugars was  $\alpha$ . The equilibrium  $\beta$  contents were calculated as 48% for NAG<sub>2</sub>, 42% for NAG<sub>3</sub>, 41% for NAG<sub>4</sub>, 39% for NAG<sub>5</sub>, and 43% for NAG<sub>6</sub> (data not shown).

#### Substrate binding preference toward crystalline $\alpha$ chitin

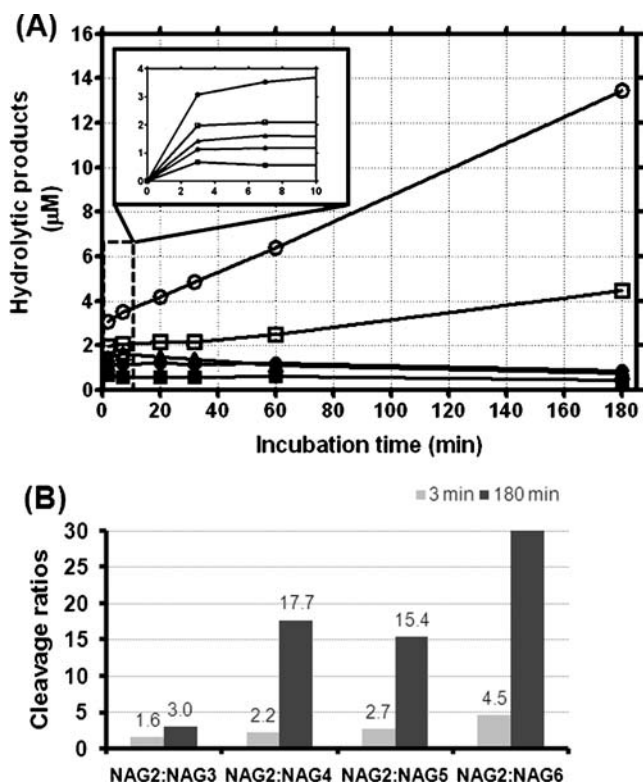
The substrate binding mode of natural substrate was further investigated. Figure 4a represents a time course of the hydrolytic products generated from crystalline  $\alpha$  chitin hydrolysis by the wild-type chitinase. Similar to previous findings [20, 34], NAG<sub>6</sub> was degraded by *V. harveyi* chitinase A, yielding NAG<sub>2</sub> major products. Other intermediates (NAG<sub>3–6</sub>) were also detected in the reaction mixture as early as 3 min although in much lower concentrations. The major isomer of NAG<sub>2</sub> products was found to be  $\beta$ , while other products gave equilibrium ratios of  $\alpha/\beta$  (Table 2). NAG<sub>2</sub> was released at least sevenfold greater than the other products over the entire range of reaction times (Fig. 4a), indicating that the enzymatic cleavage preferably took place at the second bond from the chain ends. Nevertheless, the peaks corresponding to NAG<sub>3–6</sub> that were detected in the reaction mixture

simultaneously with NAG<sub>2</sub> verified the existence of a random attack occurring at internal points of a chitin chain.

The cleavage feature of a long-chain chitin was further elucidated. The values shown in Fig. 4b represent the cleavage ratios of NAG<sub>2</sub> to NAG<sub>3</sub>–NAG<sub>6</sub>. These values were compared when the reaction was carried out at initial time (3 min) and at equilibrium (180 min). In all cases, the cleavage ratios NAG<sub>2</sub> to other sugars were found to increase when the reactions reached equilibrium. For NAG<sub>2</sub>/NAG<sub>3</sub>, the ratio was enhanced by 1.5 times, for NAG<sub>2</sub>/NAG<sub>4</sub> by nine times, for NAG<sub>2</sub>/NAG<sub>5</sub> by five times, and for NAG<sub>2</sub>/NAG<sub>6</sub> by six times. The lower cleavage ratios obtained at 3 min inferred that the internal attack proceeded at an early stage of reaction. The increased ratios represent the progressive action that took place at later time (i.e., at equilibrium).

#### Effects of point mutations on substrate bindings

Our recent data displayed a significant change in the cleavage patterns of NAG<sub>4</sub>–NAG<sub>6</sub> hydrolysis when Trp275 was mutated to Gly and Trp397 to Phe. The 3D structure of chitinase A mutant E315M bound to NAG<sub>6</sub> has located Trp275 at the main subsites  $-1$ , and  $+1$ , and Trp397 at subsite  $+2$  (Fig. 1a, b, blue). Alterations of the cleavage pattern as a result of Trp275 and Trp397 mutations provided a hint that both residues are important in defining the primary binding of soluble substrates [35]. In this study, we explored further how Trp275 and Trp397 influenced the binding selectivity of the enzyme. When incubated briefly,



**Fig. 4** Partial hydrolysis of crystalline  $\alpha$  chitin by the wild-type chitinase A. **a** Time course of chitin hydrolysis. The hydrolytic reactions were carried out at on ice ( $0^{\circ}\text{C}$ ) from 0 to 180 min and were analyzed immediately by HPLC MS. Molar concentrations of the hydrolytic products were estimated using the standard curves of NAG<sub>1-6</sub>. **b** The cleavage ratios of NAG<sub>2</sub>/NAG<sub>3-6</sub> were calculated based on the molar concentration of each corresponding sugar. The reaction products generated during 0–10 min are indicated as an inset. Open circle dimers, open square trimers, open triangle tetramers; filled circle pentamers, filled square and hexamers

the mutant W275G was found to degrade NAG<sub>5</sub> into NAG<sub>2</sub> + NAG<sub>3</sub> with the value of  $\beta$ NAG<sub>2</sub> (93%) indistinguishable to the one formed by the wild-type enzyme (90%) (Table 1). However, the  $\beta$  content of NAG<sub>3</sub> (68%) produced by the mutated enzyme significantly increased when compared with the same product produced by the wild-type enzyme (42%). With mutant W397F, the initial products of NAG<sub>5</sub> hydrolysis by W397F were more varied from NAG to NAG<sub>4</sub>. The major form of all the products produced by W397F was  $\beta$  with observed values of 81% for  $\beta$ NAG, 69% for  $\beta$ NAG<sub>2</sub>, 98% for  $\beta$ NAG<sub>3</sub>, and 96%  $\beta$ NAG<sub>4</sub> (Table 1).

Partial hydrolysis of NAG<sub>6</sub> by mutant W275G generated three product species (NAG<sub>2</sub> + NAG<sub>3</sub> + NAG<sub>4</sub>), all having  $\beta$  major isomer. The percentages of  $\beta$ NAG<sub>2</sub> (92%) and  $\beta$ NAG<sub>3</sub> (63%) were not similar to the wild-type value (Table 1). However,  $\beta$ NAG<sub>4</sub> formed by W275G (79%) was significantly greater than  $\beta$ NAG<sub>4</sub> formed by wild type (46%). Similarly, NAG<sub>6</sub> hydrolysis by mutant W397F released a full range of reaction intermediates (NAG–

NAG<sub>5</sub>). The  $\beta$  contents for NAG<sub>2</sub> (66%), NAG<sub>3</sub> (95%), and NAG<sub>4</sub> (91%) were found to be different from that obtained from the non-mutated enzyme (Table 1).

#### Effects of point mutations on the kinetic properties

The steady-state kinetics of the hydrolytic activity of wild-type chitinase A and mutants W275G and W397F were investigated by using the DNS reducing-sugar assay (see “Experimental”). Table 2 represents the kinetic values of the three chitinase variants against NAG<sub>5</sub>, NAG<sub>6</sub>, and crystalline chitin. With NAG<sub>5</sub> hydrolysis, the  $K_m$  of W275G (315  $\mu\text{M}$ ) was only slightly decreased, but the  $K_m$  of W397F (476  $\mu\text{M}$ ) was 1.25-fold elevated from the  $K_m$  of wild type (380  $\mu\text{M}$ ). Similar results were observed with NAG<sub>6</sub> hydrolysis, where the  $K_m$  of W275G (238  $\mu\text{M}$ ) was twofold lower, whereas the  $K_m$  of W397F (460  $\mu\text{M}$ ) was 2.6-fold greater than the  $K_m$  of wild type (174  $\mu\text{M}$ ).

Mutations of Trp275 and Trp397 exhibited a more severe effect on the catalytic constant ( $k_{\text{cat}}$ ) of the enzyme. With the NAG<sub>5</sub> substrate, the  $k_{\text{cat}}$  of W275G ( $0.04\text{ s}^{-1}$ ) was fivefold lower than that of wild type ( $0.21\text{ s}^{-1}$ ). In contrast, the  $k_{\text{cat}}$  of W397F ( $2.1\text{ s}^{-1}$ ) was tenfold higher. Similar results were seen with the NAG<sub>6</sub> substrate by which W275G ( $0.06\text{ s}^{-1}$ ) showed a threefold decrease, but W397F displayed a 16-fold increase in the  $k_{\text{cat}}$  compared to that of wild type ( $0.19\text{ s}^{-1}$ ).

Both mutations gave a different outcome on insoluble substrate. The  $K_m$  of W275G ( $25\text{ mg mL}^{-1}$ ) and W397F ( $19\text{ mg mL}^{-1}$ ) toward colloidal chitin were higher than that of wild type ( $12\text{ mg mL}^{-1}$ ). Both mutants displayed a 0.3–0.5-fold loss in the  $k_{\text{cat}}$ . The  $k_{\text{cat}}/K_m$  values of W275G toward all substrates were decreased five times toward NAG<sub>5</sub> and NAG<sub>6</sub> but ten times toward the crystalline chitin. In contrast, the  $k_{\text{cat}}/K_m$  values of W397F toward the short-chain substrates were increased by six- to eightfold but a fivefold decrease toward the long-chain chitin.

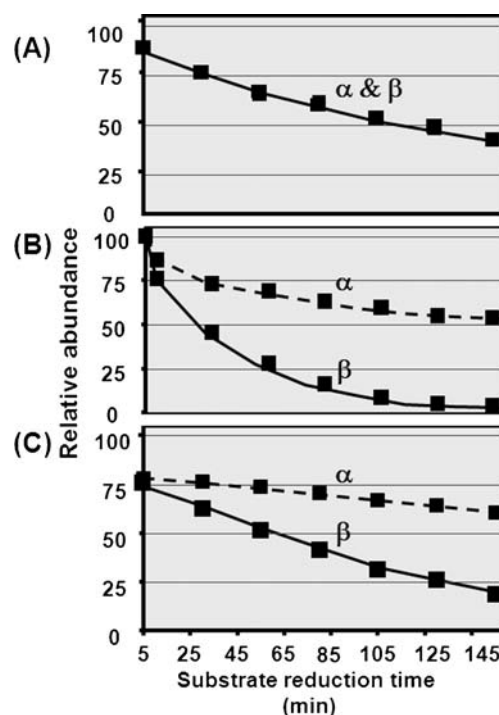
#### Effects of point mutations on the anomer selectivity

The effects of Trp275 and Trp397 mutations on the anomer selectivity of the oligosaccharide hydrolysis were further investigated. Determination of substrate decrease at different time points revealed that the wild-type enzyme degraded both  $\beta$  and  $\alpha$  anomers at equal rates (Fig. 5a). However, the initial rate of the depletion of  $\beta$ NAG<sub>5</sub> by W275G (Fig. 5a) occurred about 1.4 times faster than the rate of  $\alpha$ NAG<sub>5</sub> depletion. At 155 min of incubation, only half of  $\alpha$ NAG<sub>5</sub>, but all of  $\beta$ NAG<sub>5</sub>, was degraded.  $\beta$ NAG<sub>5</sub> was also utilized by mutant W397F at a significantly higher rate than  $\alpha$ NAG<sub>5</sub>; however, the anomer consumption varied linearly over time of incubation (Fig. 5b). At the end of reaction, a substantial amount of  $\alpha$ NAG<sub>5</sub> ( $> 50\%$ ) and only

**Table 2** Kinetic parameters of *V. harveyi* wild-type chitinase A and mutants

Chitinase A variants	pentaNAG			hexaNAG			Colloidal chitin		
	$K_m$ ( $\mu M$ )	$k_{cat}$ ( $s^{-1}$ )	$k_{cat}/K_m$ ( $s^{-1} \mu M^{-1}$ )	$K_m$ ( $\mu M$ )	$k_{cat}$ ( $s^{-1}$ )	$k_{cat}/K_m$ ( $s^{-1} \mu M^{-1}$ )	$K_m$ (mg mL $^{-1}$ )	$k_{cat}$ ( $s^{-1}$ )	$k_{cat}/K_m$ ( $s^{-1}$ (mg mL $^{-1}$ ) $^{-1}$ )
Wild type	380±49 (1)	0.21 (1)	$5.5 \times 10^{-4}$ (1)	174±23 (1)	0.19 (1)	$11 \times 10^{-4}$ (1)	12±1.4 (1)	0.10 (1)	$83 \times 10^{-4}$ (1)
W275G	315±110 (0.8)	0.04 (0.2)	$1.3 \times 10^{-4}$ (0.2)	238±17 (1.4)	0.06 (0.3)	$2.5 \times 10^{-4}$ (0.2)	25±3.7 (2.1)	0.02 (0.2)	$8.0 \times 10^{-4}$ (0.1)
W397F	476±11 (1.3)	2.1 (10)	$44 \times 10^{-4}$ (8)	460±53 (2.6)	3.0 (16)	$65 \times 10^{-4}$ (6)	19±0.1 (1.6)	0.03 (0.3)	$16 \times 10^{-4}$ (0.2)

Kinetic measurements of the hydrolytic activity of wild-type chitinase A and mutants W275G and W397F were carried out using 0–500  $\mu M$  pentaNAG, hexaNAG and colloidal chitin as substrates. After 15 min of incubation at 37 °C, the amounts of the reaction products were determined by DNS assay using a standard curve constructed from NAG<sub>2</sub>



**Fig. 5** Time-course of substrate consumption by chitinase A. Hydrolysis of NAG<sub>5</sub> by **a** wild type, **b** mutant W275G, and **c** mutant W397F. The hydrolytic reactions carried out on ice (0 °C) from 0 to 155 min were analyzed by HPLC ESI/MS as described in texts. Rate of  $\beta$  anomer consumption is presented by a black line and rate of  $\alpha$  anomer consumption by a broken line

a small amount of  $\beta$ NAG<sub>5</sub> (< 20%) remained in the reaction mixture.

With the NAG<sub>6</sub> substrate, similar patterns were observed (data not shown). The wild-type enzyme displayed no preferable selection toward a particular anomer of NAG<sub>6</sub>. However, the initial rates of  $\beta$ NAG<sub>6</sub> degradation by both mutants were only slightly higher than that of  $\alpha$ NAG<sub>6</sub> consumption. At the final stage of reaction, most of  $\beta$ NAG<sub>5</sub> and  $\beta$ NAG<sub>6</sub> (>80%) was used up.

## Discussion

The 3D structures of the catalytically inactive mutant E315M complexed with NAG<sub>5</sub> and NAG<sub>6</sub> suggested that *V. harveyi* chitinase A most likely catalyzed chitin degradation through the ‘slide and bend’ mechanism [27]. From the mechanistic point of view, the sliding process can only be achieved by an enzyme with high processivity. Eijssink and colleagues reported previously that ChiA, ChiB, and ChiC from *S. marcescens* possessed different degrees of processivity [19, 29, 30]. ChiA was tested to be more processive than ChiB, whereas ChiC is a non-processive enzyme. The processive property explains how an enzyme processes its substrates. However, the mechanism



of how each substrate initially interacts with the enzyme depends entirely on the size of its substrate. Chitin oligomers are predicted to bind to the substrate-binding cleft by a random fashion. It implies that the sugar oligomer has freedom to bind to variable sites as far as the successful cleavage is concerned. In this study, three models are proposed for the productive binding of the soluble substrates (Fig. 1). NAG<sub>5</sub> may interact either with subsites (−4 to +1), (−3 to +2), or (−2 to +2) (Fig. 2a). Likewise, NAG<sub>6</sub> may bind to subsites (−4 to +2), (−3 to +2), or (−2 to +2) (Fig. 2b).

HPLC MS analysis of NAG<sub>6</sub> hydrolysis by wild-type chitinase gave rise to three species of reaction products (NAG<sub>2,3,4</sub>). This happens only when the glycosidic cleavage takes place at least at two distinct locations. The presence of NAG<sub>3</sub> in the reaction mixture (Table 1) suggested that the enzymatic cleavage occurred in the middle of the chitin hexamer. When initial isomers of the degradation products were trapped at very low temperature (0 °C) for a short period of time (3 min), the estimated βNAG<sub>3</sub> (65%) agreed best to that of NAG<sub>3</sub> expected from the (−3 to +2) binding mode (71%) (the value in brackets, Table 1). Two other products (NAG<sub>2</sub> and NAG<sub>4</sub>) could otherwise come from the interactions at subsites −4 to +2 or −2 to +2. However, the measured percentages of βNAG<sub>2</sub> (90%) and βNAG<sub>4</sub> (46%) were in conflict with the calculated values for the (−4 to +2) binding mode (100% for both βNAG<sub>2</sub> and βNAG<sub>4</sub>). Instead, the obtained values agreed well with the 100% βNAG<sub>2</sub> and 48% βNAG<sub>4</sub> as calculated for the (−2 and +2) binding mode (Fig. 2b). This experimental outcome suggests binding of the chitin hexamer to either subsites −3 to +2 or −2 to +2, which emphasizes a dynamic process of interaction between an active enzyme and the substrate, and is in contrast with the occupation of the oligomer as observed in the static complex of the inactive enzyme (Fig. 1a, b). Previous quantitative HPLC MS analysis estimated the yield of NAG<sub>3</sub> to be 4 nmol when NAG<sub>6</sub> was incubated with native chitinase A for 5 min. This yield was half of NAG<sub>2</sub>+NAG<sub>4</sub> yields (~8 nmol) obtained from the same reaction [34], and it indicated that NAG<sub>6</sub> favors the (−2 to +2) mode over the (−3 to +2) mode.

Limited hydrolysis of NAG<sub>5</sub> yielded only two products (NAG<sub>2</sub>+NAG<sub>3</sub>), meaning that the bond cleavage took place only at a single site either at positions −3 to +2 or −2 to +2 (see Fig. 2A). However, the observed percentages of βNAG<sub>2</sub> (90%) and βNAG<sub>3</sub> (42%) agreed more to that of βNAG<sub>2</sub> (100%) and βNAG<sub>3</sub> (42%) predicted for the (−2 to +2) binding mode. In contrast, 100% βNAG<sub>2</sub> and 100% βNAG<sub>3</sub> would be expected from the (−3 to +2) binding mode. No detection of NAG and NAG<sub>4</sub> in the reaction mixture implied that the (−4 to +1) mode was completely ignored by this substrate (see Table 1).

The binding characteristics of *S. marcescens* Chi A [40] and *Coccidioides immitis* chitinase-1 (CiX1) [41] were previously investigated by means of typical HPLC systems. Hydrolysis of NAG<sub>6</sub> by SmChiA that yielded 99% βNAG<sub>2</sub>, 71% βNAG<sub>3</sub> and 48% βNAG<sub>4</sub> and hydrolysis of NAG<sub>5</sub> that yielded 100% βNAG<sub>2</sub> and 55% βNAG<sub>3</sub> represents the equivalent binding events as observed in this study. In CiX1, formations of α/βNAG<sub>2</sub> (9/1) and α/βNAG<sub>4</sub> (5/2) from NAG<sub>6</sub> hydrolysis supports the (−2 to +2) binding mode. Sasaki et al. [42] performed a comparative study of the reaction mechanism of rice and bacterial enzymes and concluded that microbial chitinases favors the (−2)(−1)(+1) (+2)(+3)(+4) subsites, while plant chitinases prefers the (−4)(−3)(−2)(−1)(+1)(+2) subsites. Binding of a chitooligomer to (−2) to (+4) sites would be comparable to the −2 to +2 binding mode described for *V. harveyi* chitinase A.

With partial hydrolysis of insoluble chitin, NAG<sub>2</sub> observed as the primary product during the course of reaction (from 0 to 180 min) was mostly derived from the progressive degradation of the second bond from a chain end of chitin polymer. Imai et al. [33] demonstrated previously that the degradation of β chitin microfibrils took place from the reducing end of the sugar chain. However, other products (NAG<sub>3–6</sub>) that were observed in the reaction mixture, even as early as 3 min, and the equilibrium ratios of NAG<sub>3–6</sub> products obtained from a long-chain chitin hydrolysis (Table 1) were an indication of internal attacks that took place at variable positions within the chitin chain. This interpretation is further supported by the small cleavage ratios of NAG<sub>2</sub>/NAG<sub>3–6</sub> intermediates. A dramatic increase in the ratios at later time of reaction is presumably achieved quite productively with the progressive action via the feeding and sliding mechanism.

The anomer analysis revealed no selectivity of the wild-type chitinase A in utilization of α or β substrates (Fig. 5a). No selectivity of binding by all means leaves the enzyme a lot more freedom to efficiently take up the β or α substrates that are present in the reaction equilibrium. This idea is well complimented by binding of NAG<sub>5</sub> to subsites (−2 to +2) and NAG<sub>6</sub> to subsites (−3 to +2) or (−2 to +2) as seen in Fig. 2a and b. For the structural point of view, *V. harveyi* chitinase A is shown to comprise a substrate binding cleft with a long, deep groove structure (Fig. 1). The reducing end of the binding groove is shown to be open, giving adequate space for the incoming sugar chain to move beyond the +2 site. As a consequence, various glycosidic bonds are accessible to the cleavage site. The open-end active site certainly fits the binding preference of NAG<sub>5</sub> and NAG<sub>6</sub> and the endo action of the enzyme toward chitin polymers.

We previously reported that the residues Trp275 and Trp397 positioned at subsites (−1, +1, and +2 sites) are particularly essential for defining the primary binding of

soluble chitooligosaccharides and Trp70 located at the N-terminal end of the ChBD is crucial for insoluble chitin degradation [35, 43]. In this study, the effects of mutations on the kinetic properties of the enzyme were evaluated. It was found that mutations of Trp275 and Trp397 to Gly and Phe, respectively, significantly changed the substrate specificity and the anomer selectivity of the enzyme. The structure of mutant E315M bound to NAG<sub>6</sub> showed that Trp275 could interact strongly with -1NAG and +1NAG [27]. Mutation of this residue was found to affect the kinetic properties involving the catalytic center by decreasing the  $k_{\text{cat}}$  and the  $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$  toward NAG<sub>5</sub> and NAG<sub>6</sub> by a magnitude of 5 (Table 2). In addition, the mutation significantly increased the apparent rate of  $\beta$  consumption as shown in Fig. 5a. The event may be explained as a shift of the sugar chain toward the non-reducing end in the search for other available binding sites to compensate for the loss of interactions. The observed yields of  $\beta$ NAG<sub>2</sub> (93%) and  $\beta$ NAG<sub>3</sub> (68%) obtained from the cleavage of NAG<sub>5</sub> by W275G (Table 1) agrees well with the predicted yields of  $\beta$ NAG<sub>2</sub> (100%) and  $\beta$ NAG<sub>3</sub> (42–100%) of the model shown in Fig. 6a. A single move of the sugar chain toward the non-reducing end is predicted as further movement would likely be blocked by high affinity of binding between the reducing end of NAG<sub>5</sub> and Trp397 at subsite +2.

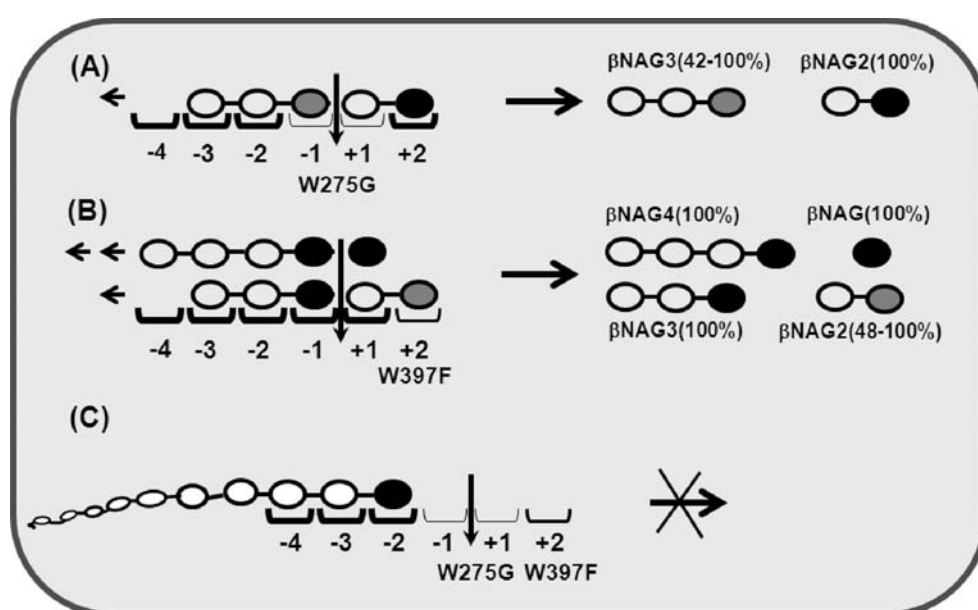
Different situations were observed with mutant W397F. Mutation of Trp397 to Phe led to an increase in the  $k_{\text{cat}}$  toward NAG<sub>5</sub> and NAG<sub>6</sub> by 10- and 16-fold, giving rise to an increase in the  $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$  by a magnitude of 8 and 16, respectively. Trp397 is a crucial binding residue located at subsite +2, and it determines the primary binding of chitooligosaccharide substrates. A phenylalanine substitu-

tion appeared to weaken the binding strength of this subsite, enabling the sugar chain to move more freely and allowing various glycosidic bonds to be exposed to the cleavage sites. A full range of reaction intermediates seen in the reaction mixture of W397F (Table 1) supports the above assumption. Hydrolysis of NAG<sub>5</sub> by W397F, yielding 81%  $\beta$ NAG, 69%  $\beta$ NAG<sub>2</sub>, 98%  $\beta$ NAG<sub>3</sub>, and 96%  $\beta$ NAG<sub>4</sub> products agreed well with the yields proposed in Fig. 6b.

The residues Trp275 and Trp397 are found to be important for insoluble chitin hydrolysis, since the mutations showed a remarkable decrease in the  $k_{\text{cat}}$  value of the enzyme. The structure in Fig. 1 shows that both residues are located in a perfect position to be responsible for the feeding process by pulling the chitin chain toward the reducing end subsites, thereby permitting the next processive hydrolysis to occur (see Fig. 6c). A significant reduction of the  $k_{\text{cat}}$  and the  $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$  values toward colloidal chitin (Table 2) seems to support the proposed roles of both residues (Table 2). Similar effects were also reported with ChiA1 from *B. circulans*, where mutations of Trp164 (equivalent to Trp275) and Trp285 (equivalent to Trp397) drastically reduced the hydrolytic activity of their enzymes toward colloidal chitin by 40–50% [44].

In conclusion, we employed quantitative HPLC MS to determine the binding modes of a family-18 chitinase from *V. harveyi* toward three substrates. Neither a random nor a progressive binding was entirely employed for a complete hydrolysis of the tested substrates. Nevertheless, soluble chitins seem to favor the -2 to +2 binding, but insoluble chitin preferred the progressive binding. Mutations of Trp275 and Trp397 were found to affect the anomer selectivity and the substrate specificity toward soluble substrates. The evaluation of the kinetic data suggested

**Fig. 6** Plausible effects of point mutation on the substrate binding preference and the anomer selectivity. Binding of NAG<sub>5</sub> to **a** wild-type chitinase, **b** mutant W275G, and **c** mutant W397F. The  $\beta$  configuration is shown in black circle, NAG residue with  $\alpha$  or  $\beta$  configuration with an equilibrium ratio is shown in gray circle, and NAG residue with  $\alpha$  or  $\beta$  configuration that binds to a loosen-affinity binding site is shown in gray-filled in dark circle. The cleavage site is indicated by an arrow



that Trp275 and Trp397 are likely involved in the feeding process that facilitates a degradation of chitin polymer in a progressive manner. Ultimately, understanding of the binding mechanism of family-18 chitinases to their substrates may aid the drug-screening program to obtain effective inhibitors that act as therapeutic candidates for successful treatment of allergic asthma.

**Acknowledgements** This work is financially supported by Suranaree University of Technology, The Thailand Research Fund and The Thai Commission on Higher Education through a Research Career Development Grant to WS (grant no. RMU4980028). The Thailand Research Fund through the Royal Golden Jubilee PhD Program (grant no. PHD/0238/2549) to SP and WS is acknowledged.

## References

- Hirono I, Yamashita M, Aoki T (1998) Note: molecular cloning of chitinase genes from *Vibrio anguillarum* and *V. parahaemolyticus*. J Appl Microbiol 84:1175–1178
- Suginta W, Robertson PA, Austin B et al (2000) Chitinases from *Vibrios*: activity screening and purification of chi A from *Vibrio carchariae*. J Appl Microbiol 89:76–84
- Keyhani NO, Roseman S (1999) Physiological aspects of chitin catabolism in marine bacteria. Biochim Biophys Acta 1473:108–122
- Merzendorfer H, Zimoch L (2003) Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. J Exp Biol 206:4393–4412
- Herrera-Estrella A, Chet I (1999) Chitinases in biological control. EXS 87:171–184
- Melchers LS, Stuijver MH (2000) Novel genes for disease-resistance breeding. Curr Opin Plant Biol 3:147–152
- Gooday GW, Zhu WY, O'Donnell RW (1992) What are the roles of chitinases in the growing fungus? FEMS Microbiol Lett 100:387–392
- Wills-Karp M, Karp CL (2004) Chitin checking—novel insights into asthma. N Engl J Med 351:1455–1457
- Kawada M, Hachiya Y, Arihiro A et al (2007) Role of mammalian chitinases in inflammatory conditions. Keio J Med 56:21–27
- Zhu Z, Zheng T, Homer RJ et al (2004) Elias acidic mammalian chitinase in asthmatic Th2 inflammation and IL-13 pathway activation. Science 304:1678–1682
- Watanabe T, Suzuki K, OyaGi W et al (1990) Gene cloning of chitinase A1 from *Bacillus circulans* WL-12 revealed its evolutionary relationship to *Serratia* chitinase and to the type III homology units of fibronectin. J Biol Chem 265:15659–15665
- Jones JDG, Grady KL, Suslow TV et al (1986) Isolation and characterization of genes encoding two chitinase enzymes from *Serratia marcescens*. EMBO J 5:6467–6473
- Roffey PE, Pemberton JM (1990) Cloning and expression of an *Aeromonas hydrophila* chitinase gene in *Escherichia coli*. Curr Microbiol 21:329–337
- Sitrit Y, Vorgias CE, Chet I et al (1995) Cloning and primary structure of The chiA gene from *Aeromonas caviae*. J Bacteriol 177:4187–4189
- Tsujibo H, Orikoshi H, Tanno H et al (1993) Cloning, sequence, and expression of a chitinase gene from a marine bacterium, *Alteromonas* sp. strain O-7. J Bacteriol 175:176–181
- Suginta W (2007) Identification of chitin binding proteins and characterization of two chitinase isoforms from *Vibrio alginolyticus* 283. Enzyme Microb Tech 41:212–220
- Itoi S, Kanomata Y, Koyama Y et al (2007) Identification of a novel endochitinase from a marine bacterium *Vibrio proteolyticus* strain No. 442. Biochim Biophys Acta 1774:1099–1107
- Suzuki K, Sugawara N, Suzuki M et al (2002) Chitinases A, B, and C1 of *Serratia marcescens* 2170 produced by recombinant *Escherichia coli*: enzymatic properties and synergism on chitin degradation. Biosci Biotechnol Biochem 66:1075–1083
- Sikorski P, Sørbotten A, Horn SJ et al (2006) *Serratia marcescens* chitinases with tunnel-shaped substrate-binding grooves show endo activity and different degrees of processivity during enzymatic hydrolysis of chitosan. Biochemistry 45:9566–9574
- Suginta W, Vongsuwan A, Songsiririthigul C et al (2004) An endochitinase A from *Vibrio carchariae*: cloning, expression, mass and sequence analyses, and chitin hydrolysis. Arch Biochem Biophys 424:171–180
- Perrakis A, Tews I, Dauter Z et al (1994) Crystal structure of a bacterial chitinase at 2.3 Å resolution. Structure 2:1169–1180
- Tews I, Terwisscha van Scheltinga AC, Perrakis A et al (1997) Substrate assisted catalysis unifies two families of chitinolytic enzymes. J Am Chem Soc 119:7954–7959
- Terwisscha van Scheltinga AC, Armand S, Kalk KH et al (1995) Stereochemistry of chitin hydrolysis by a plant chitinase/lysozyme and X-ray structure of a complex with allosamidin: evidence for substrate assisted catalysis. Biochemistry 34:15619–15623
- Hollis T, Monzingo AF, Bortone K et al (2000) The X-ray structure of a chitinase from the pathogenic fungus *Coccidioides immitis*. Protein Sci 9:544–551
- Brameld KA, Goddard WA III (1998) Substrate distortion to a boat conformation at subsite -1 is critical in the mechanism of family 18 chitinases. J Am Chem Soc 120:3571–3580
- Terwisscha van Scheltinga AC, Hennig M, Dijkstra BW (1996) The 1.8 Å resolution structure of hevamine, a plant chitinase/lysozyme, and analysis of the conserved sequence and structure motifs of glycosyl hydrolase family 18. J Mol Biol 262:243–257
- Songsiririthigul C, Pantoom S, Aguda AH et al (2008) Crystal structures of *Vibrio harveyi* chitinase A complexed with chitooligosaccharides: implications for the catalytic mechanism. J Struct Biol 162:491–499
- Uchiyama T, Katouno F, Nikaidou N et al (2001) Roles of the exposed aromatic residues in crystalline chitin hydrolysis by chitinase A from *Serratia marcescens* 2170. J Biol Chem 276:41343–41349
- Sørbotten A, Horn SJ, Eijsink VG et al (2005) Degradation of chitosans with chitinase B from *Serratia marcescens*. Production of chitooligosaccharides and insight into enzyme processivity. FEBS J 272:538–549
- Horn SJ, Sørbotten A, Synstad B et al (2006) Endo/exo mechanism and processivity of family 18 chitinases produced by *Serratia marcescens*. FEBS J 273:491–503
- Boisset C, Fraschini C, Schülein M et al (2000) Imaging the enzymatic digestion of bacterial cellulose ribbons reveals the endo character of the cellobiohydrolase Cel6A from *Humicola insolens* and its mode of synergy with cellobiohydrolase Cel7A. Appl Environ Microbiol 66:1444–1452
- Imai T, Boisset C, Samejima M et al (1998) Unidirectional processive action of cellobiohydrolase Cel7A on Valonia cellulose microcrystals. FEBS Lett 432:113–116
- Imai T, Watanabe T, Yui T, Sugiyama J (2002) Directional degradation of beta-chitin by chitinase A1 revealed by a novel reducing end labelling technique. FEBS Lett 510:201–205
- Suginta W, Vongsuwan A, Songsiririthigul C et al (2005) Enzymatic properties of wild-type and active site mutants of chitinase A from *Vibrio carchariae*, as revealed by HPLC-MS. FEBS J 272:3376–3386

35. Suginta W, Songsiriritthigul C, Kobdaj A et al (2007) Mutations of Trp275 and Trp397 altered the binding selectivity of *Vibrio carchariae* chitinase A. *Biochim Biophys Acta* 1770:1151–1160
36. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685
37. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254
38. Miller GL (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem* 31:426–429
39. Armand S, Tomita H, Heyraud A et al (1994) Stereochemical course of the hydrolysis reaction catalysed by chitinase A1 and D from *Bacillus circulans* WL-12. *FEBS Lett* 343:177–180
40. Aronson NN Jr, Halloran BA, Alexyev MF et al (2003) Family 18 chitinase-oligosaccharide substrate interaction: subsite preference and anomer selectivity of *Serratia marcescens* chitinase A. *Biochem J* 376:87–95
41. Fukamizo T, Sasaki C, Schelp E et al (2001) Kinetic properties of chitinase-1 from the fungal pathogen *Coccidioides immitis*. *Biochemistry* 40:2448–2454
42. Sasaki C, Yokoyama A, Itoh Y et al (2002) Comparative study of the reaction mechanism of family 18 chitinases from plants and microbes. *J Biochem* 131:557–564
43. Pantoom S, Songsiriritthigul C, Suginta W (2008) The effects of the surface-exposed residues on the binding and hydrolytic activities of *Vibrio carchariae* chitinase A. *BMC Biochem* 9:2
44. Watanabe T, Ariga Y, Sato U et al (2003) Aromatic residues within the substrate-binding cleft of *Bacillus circulans* chitinase A1 are essential for hydrolysis of crystalline chitin. *Biochem J* 376:237–244