



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 การวิเคราะห์น้ำตาลผลิตภัณฑ์ที่สร้างขึ้นโดยวิธี TLC พบว่าเมื่อกรดอะมิโนที่ตำแหน่งรีดิวซ์ Trp275 ถูกเปลี่ยนเป็น Gly และ Trp397 เปลี่ยนเป็น Phe ทำให้รูปแบบการสลายน้ำตาลสายสั้นเปลี่ยนไปอย่างสิ้นเชิงแสดงว่ากรดอะมิโนทั้งสองน่าจะมีความสำคัญต่อการเลือกจับของน้ำตาลไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ การศึกษาการจับกับไคตินและการทดลองทางจุลนาโนวิทยาศาสตร์แสดงให้เห็นว่า Trp70 ซึ่งพบอยู่ที่ผิวที่ปลายด้านเอ็นของโดเมนจับไคตินมีความสำคัญมากต่อการจับกับไคตินสายยาว การตรวจหารูปแบบการจับของสับสเตรทโดยเทคนิค HPLC MS พบว่า NAG_6 ซอบบริเวณจับ -2 ถึง +2 มากกว่าบริเวณจับ -3 ถึง +2 ส่วน NAG_5 จะจับกับบริเวณจับ -2 ถึง +2 อย่างเดียวในขณะที่ crystalline α chitin จะเริ่มจับที่บริเวณจับได้หลายตำแหน่งทำให้สลายตัวกลางไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ได้หลายชนิดซึ่งตัวกลางเหล่านี้จะจับกับตำแหน่ง -2 ถึง +2 เป็นหลัก นอกจากนี้ยังพบว่าไคติเนสกลายพันธุ์ W275G และ W397F มีความชอบต่อสับสเตรทชนิด β มากกว่าสับสเตรทชนิด α 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 NAG_5 แต่โครงรูปงอของน้ำตาล 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 NAG₆ preferred subsites -2 to +2 over subsites -3 to +2 and NAG₅ only bound to subsites -2 to +2. Crystalline α 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 β substrates over α 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 (α/β)₈ 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 NAG₅, but a bent conformation of NAG₆. 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 ผู้วิจัยได้ทำการแยกและโคลนยีนของไคติเนสเอจากเชื้อนี้ได้ หลังจากนั้นนำยีนที่ได้ไปทำการแสดงออกโดยให้ผลิตรีคอมบิแนนท์ไคติเนสใน *E. coli* ได้สำเร็จ งานวิจัยที่นำเสนอนี้ต้องการสร้างไคติเนสกลายพันธุ์โดยเทคนิค site-directed mutagenesis เพื่อศึกษาบทบาทของกรดอะมิโนต่าง ๆ ที่บริเวณเร่งและบริเวณผิวของเอนไซม์ในการเร่งปฏิกิริยาหรือในการจับกับสับสเตรทชนิดต่าง ๆ การศึกษาโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ไคติเนสที่มีและไม่มีสับสเตรทจับอยู่จะทำให้เข้าใจกลไกการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ งานวิจัยนี้ถือเป็นงานวิจัยพื้นฐานระดับโมเลกุลโดยมีจุดมุ่งหมายระยะยาวที่จะประยุกต์ใช้เทคโนโลยีทางเอนไซม์

ในการแก้ปัญหาสิ่งแวดล้อมและการเปลี่ยนภาคชีวิตที่มีจำนวนมากในธรรมชาติให้เกิดประโยชน์ทางการเกษตร การแพทย์และอุตสาหกรรม

2. วัตถุประสงค์ของโครงการ

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

3. ระเบียบวิธีวิจัย

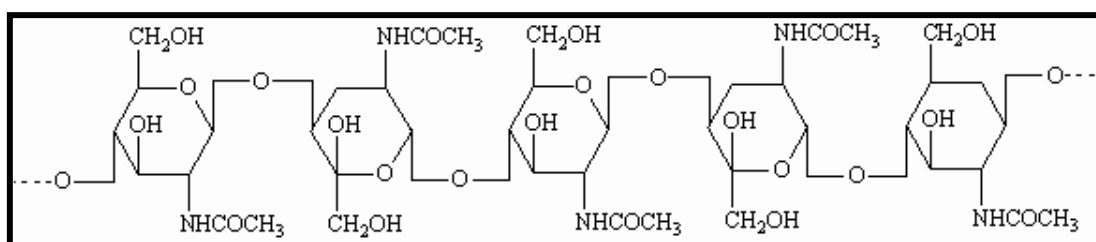
1. ตรวจสอบเอกสารและค้นคว้าหาข้อมูลที่เกี่ยวข้องจากห้องสมุดมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีและห้องสมุดมหาวิทยาลัยที่มีเอกสารอ้างอิงที่เกี่ยวข้อง หรือการค้นหากจากอินเทอร์เน็ต
2. การจัดซื้อสารเคมีแล้วสต็อกเพื่อเริ่มทำงานวิจัย โดยงานวิจัยเริ่มที่ห้องปฏิบัติการวิจัยของสาขาวิชาชีวเคมี อาคารศูนย์เครื่องมือรวม F1 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 ไคตินเป็นชีวโพลิเมอร์ที่มีปริมาณมากที่สุดในอันดับที่สองรองจากเซลลูโลสโดยมีการประมาณปริมาณของไคตินที่มีการผลิตในโลกนี้มากถึง 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 ปฏิบัติการเกิดขึ้นได้รวดเร็วและสมบูรณ์ และไม่ก่อให้เกิดสารพิษตกค้างหลังปฏิบัติการย่อยสลาย

ในธรรมชาติการย่อยสลายไคตินอย่างสมบูรณ์ประกอบด้วยการทำงานของเอนไซม์สองชนิด ขั้นตอนหลัก ๆ คือไคตินโพลิเมอร์ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ไคตินเนส (EC3.2.1.14) ให้เป็นน้ำตาลสายสั้น ๆ หรือไคตินโอลิโกเมอร์ให้ผลผลิตสุดท้ายเป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่ ขั้นตอนต่อมาคือการย่อยน้ำตาลโมเลกุลคู่ให้เป็น

น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวด้วยเอนไซม์บีต้าเอนอะซิทิลกลูโคซามิเนส หรือโคโตไบเอส (β -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) เก่าที่ปีกแมลงเพื่อสร้างคิวติเคิลใหม่ขึ้นมา (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 (α/β)₈ 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 ส่วนทางเทคโนโลยีชีวภาพมีการใช้เอนไซม์ในการทำดักกากของ

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) ต่อไคโตโอลิโกแซคคาไรด์มากขึ้นเมื่อสายของไคโตโอลิโกเมอร์ยาวขึ้นซึ่งแสดงถึงโครงสร้างของบริเวณเร่งที่มีลักษณะเป็นแบบ 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 ต่อการจับสายไคตินและอิทธิพลของกรดอะมิโนเหล่านี้ที่มีต่อเอนไซม์ในการสลายสับสเตรทไคตินและไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ต่าง 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 OD₆₀₀ 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 Ni²⁺ ด้วย 250 mM imidazole นำ fraction ที่ได้มาวิเคราะห์หาความบริสุทธิ์ด้วย 12% SDS-PAGE ตามวิธีของ Laemmli (Laemmli, 1970) ทำการรวม fraction ที่มีแถบโปรตีนโคติเนสที่ตำแหน่ง 63 kDa เข้าด้วยกันแล้วนำมาผ่าน membrane filtration (M_r 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-GlcNAc₂ เป็นสับสเตรท โดยทำปฏิกิริยาใน 96-well microtiter plate ทำปฏิกิริยา 100-µl ที่ประกอบด้วย 10 µl เอนไซม์ 500 µM pNP-(GlcNAc)₂ และ 100 mM sodium acetate buffer, pH 5.5 ที่ 37°C เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม 1.0 M Na₂CO₃ (50 µl) แล้ววัดหาปริมาณ *p*-nitrophenol (pNP) ที่ค่าดูดกลืนแสง A₄₀₅ 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 A₅₈₅ โดยใช้กราฟมาตรฐาน

ของ GlcNAc₂ ที่ช่วง 0-1.75 μmol เพื่อหาความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ ส่วน crystalline α -chitin ทำวิธีเดียวกันกับ colloidal chitin แต่ใช้ปริมาณเอนไซม์ในการทำปฏิกิริยาปริมาณ 400 μg (Pantoom et al., 2008)

2.3. การวิเคราะห์น้ำตาลโดยเทคนิค TLC

ทำการศึกษาปฏิกิริยาการสลายโคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (NAG₂-NAG₆) ของเอนไซม์โคติเนสดั้งเดิมและโคติเนสกลายพันธุ์ในปริมาตร 20 μl 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 μl 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:H₂O (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 NAG₅ และ NAG₆ ในปริมาตร 50 μl ที่ประกอบด้วย 500 μM 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 μl ลงใน 200- μl vial แล้วนำไปแยกด้วย HPLC ที่ต่อกับเครื่อง ESI/MS โดยคอลัมน์ที่ใช้คือ Hypercarb®column (ThermoQuest, Thermo Electron Corporation, San Jose, CA, USA) ขนาด 150 × 2.1 mm 5 μm 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 β/α 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 NAG₂, m/z 627.5 สำหรับ NAG₃, m/z 830.3 สำหรับ NAG₄, m/z 1034.16 สำหรับ NAG₅ สำหรับ m/z 1236.3 สำหรับ NAG₆ (Suginta et al., 2009)

2.5. การทำ Chitin Binding Assay

ทำการศึกษาการจับกับสับสเตรทด้วยวิธี chitin binding assay ทำปฏิกิริยา (500 μl) ประกอบด้วย 1.0 μmol 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°C เพื่อลดอัตราการสลายของสับสเตรทโดยเอนไซม์ ณ เวลาที่ต้องการทำการปั่นแยกเอนไซม์อิสระออกจากเอนไซม์ที่จับกับโคติน ด้วยความเร็ว 12000 g ที่ 4°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°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 μl ประกอบด้วย 0–500 μM pNP-GlcNAc₂ ในสารละลาย 100 mM sodium acetate buffer, pH 5.0 และ dH₂O โดยทำการ pre-incubate ของเหลวใน microtiterplate ที่ 37°C เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นเติมเอนไซม์ปริมาณ 400 ng และบ่มปฏิกิริยาต่อไปอีก 10 นาที ที่อุณหภูมิ 37°C แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม 50 μl 1 M Na₂CO₃ 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 μl ที่มี 0–500 μM NAG₆ กับ 50 μg เอนไซม์ ใน 100 mM sodium acetate buffer, pH 5.5 ที่ 37°C เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยการต้มที่ 100°C เป็นเวลา 3 นาที แล้วนำปริมาตรทั้งหมดในปฏิกิริยามาวัดหาน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DMAB assay ส่วน colloidal chitin ใช้วิธีเดียวกันกับน้ำตาล chitohexaose แต่ใช้ความเข้มข้น 0 to 5.0 % (w/v) ทำการวัดผลิตภัณฑ์น้ำตาลที่เกิดขึ้นจากกราฟมาตรฐานของน้ำตาล GlcNAc₂ ที่ช่วง 0–1.75 μmol 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) ทำการหาตำแหน่งของกรดอะมิโนที่บริเวณเร่งโดย superimpose กรดอะมิโน 459 ตัวของโครงสร้างที่ทำนายได้ของเอนไซม์โคติเนส เอ จากเชื้อ *Vibrio* กับ กรดอะมิโนที่ตำแหน่งเดียวกันกับเอนไซม์ของ *Serratia* แล้ว dock น้ำตาล hexaNAG 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 โดยการทำ 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 ด้วยสับสเตอร์ท ได้จากการปลูกผลึกที่ 16% (w/v) PEG 4000, 0.1 M 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 NAG_5 or 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⁺⁺ 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+NAG₅ และ E315M+NAG₆ 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+NAG₅ และ E315M+NAG₆ 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

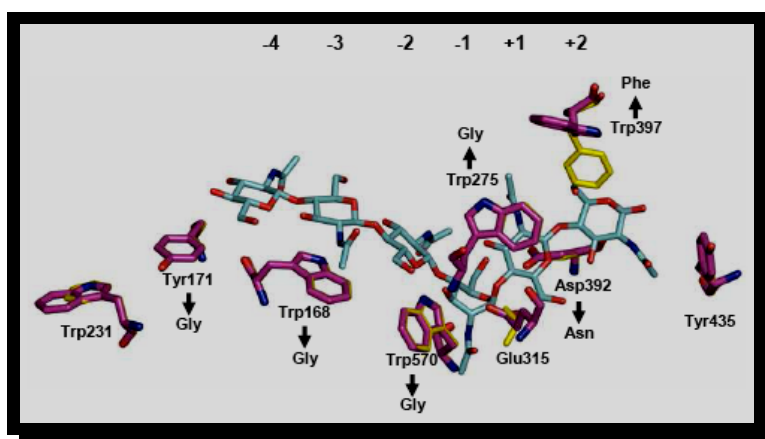
3.1. การศึกษาผลของการกลายพันธุ์ของกรดอะมิโนที่บริเวณเร่ง

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



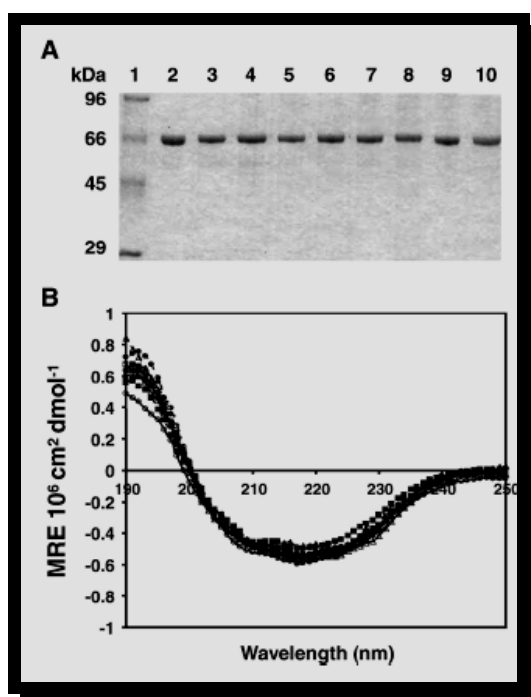
รูปที่ 1 แสดงแบบจำลองโครงสร้างสามมิติของโคติเนส เอ จากแบคทีเรีย *Vibrio carchariae* ที่แสดงตำแหน่งของกรดอะมิโนวงแหวน Trp168 Tyr171 Trp275 Trp397 และ Trp570 ที่บริเวณด้านบนของ TIM barrel domain (แหล่งที่มา Suginta et al., BBA-General Subjects, 2007)

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 การจัดเรียงตัวของกรดอะมิโนวงแหวนที่บริเวณเร่งของโคติเนส 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]₂ และ colloidal chitin พบว่าโปรตีนกลายพันธุ์ทั้งหมดยกเว้น W397F ให้ค่า specific activity ต่ำกว่าค่าของโปรตีน wild-type ส่วน W397F ให้ค่า specific activity ของการสลาย pNP-[GlcNAc]₂ 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	
	($\times 10^{-3}$ $\mu\text{mol pNP/min}/\mu\text{g}$) ^a	($\mu\text{mol reducing sugars/min}/\mu\text{g}$) ^b
Wild-type	1.84 $\pm$ 0.05 (100) ^c	1.99 $\pm$ 0.018 (100)
D392N	0.61 $\pm$ 0.09 (33.4)	n.d. ^d
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.

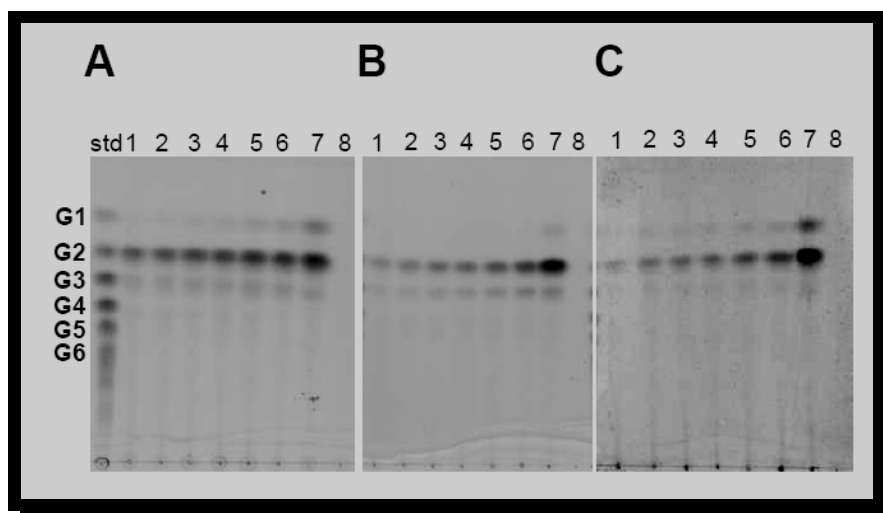
^a Chitinase activity was measured using pNP-[GlcNAc]₂, and release of pNP was detected by the colorimetric method.

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

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

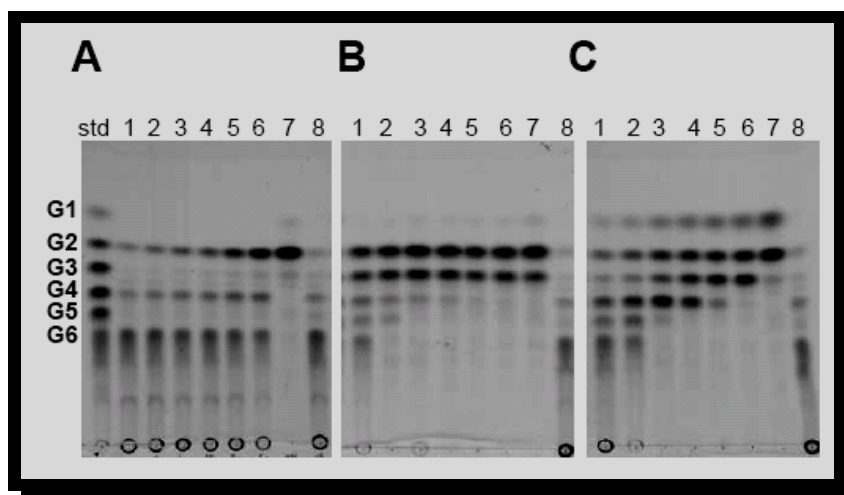
^d n.d. represents no detectable activity.

ผลการทดลองที่ได้จากตารางที่ 2 ให้ข้อสรุปว่าการเปลี่ยนกรดอะมิโนวงแหวน W397 มีผลต่อการสลายของสับสเตรทโมเลกุลเล็ก ๆ และไคตินโพลิเมอร์ จากการวิเคราะห์ชนิดของผลิตภัณฑ์น้ำตาลที่ได้จากการสลาย colloidal chitin และไคโตโอลิโกแซคคาร์ไรด์ขนาด 2-6 หน่วย (NAG₂-NAG₆) 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 NAG₂ และผลิตภัณฑ์รองคือ NAG₁ 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 NAG_2 ได้เลยและ W275G เป็นโปรตีนตัวเดียวที่สลาย 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 NAG_6 ได้เป็นน้ำตาล $\text{NAG}_2 + \text{NAG}_3$ เป็นหลัก ส่วนโปรตีน W397F สลายน้ำตาล NAG_6 ให้เป็นตัวกลางขนาดต่าง ๆ ตั้งแต่ $\text{NAG}_1 - \text{NAG}_5$ และที่เวลาของการบ่มเป็น 18 ชั่วโมงจะได้ผลผลิตที่เป็น $\text{NAG}_2 + \text{NAG}_1$ ซึ่งลักษณะการย่อยน้ำตาล NAG_6 ของโปรตีนกลายพันธุ์ทั้งสองต่างไปจากโปรตีน wild-type อย่างสิ้นเชิง (รูปที่ 5) โดยที่ผลผลิตหลักของการสลาย NAG_6 ของ wild-type คือน้ำตาล $\text{NAG}_2 + \text{NAG}_4$

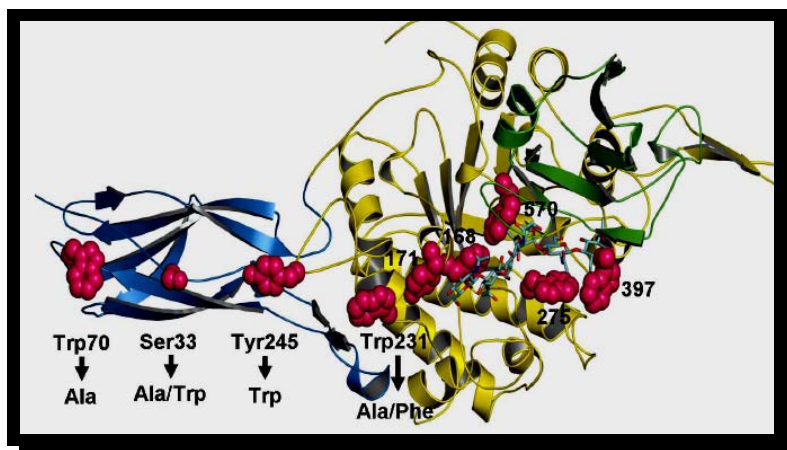


รูปที่ 5 การวิเคราะห์ทาง TLC ที่แสดงรูปแบบการสลาย hexaNAG ด้วย A) wild-type B) W275G และ C) W397F ช่องที่ std คือ G1-G6 standard mix; 1-7 เวลาที่ใช้ในการบ่มตั้งแต่ 2, 5, 10, 15, 30, 60 นาที และ 18 ชั่วโมง; 8 คือ substrate blank (แหล่งที่มา Suginta et al., BBA-General Subjects, 2007)

จากรูปที่ 2 พบว่ากรดอะมิโน W275 จัดเรียงตัวอยู่ในตำแหน่ง จับที่ -1 ส่วนกรดอะมิโน W397 จะอยู่ในบริเวณจับสุดท้ายคือ +2 กรดอะมิโนทั้งสองน่าจะเป็นตัวกำหนดการจับของน้ำตาล NAG_6 ให้เข้ามาอยู่ในตำแหน่งที่เหมาะสมที่จะทำให้เกิดการย่อยที่พันธะที่สองจากด้านรีดิวซ์เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็น $\text{NAG}_2 + \text{NAG}_4$ การเปลี่ยนแปลงชนิดของกรดอะมิโนทำให้กรดอะมิโน Trp275 และ Trp397 สูญเสียความสามารถในการเลือกจับแบบจำเพาะทำให้ผลิตภัณฑ์แตกต่างไปจากเดิมมาก

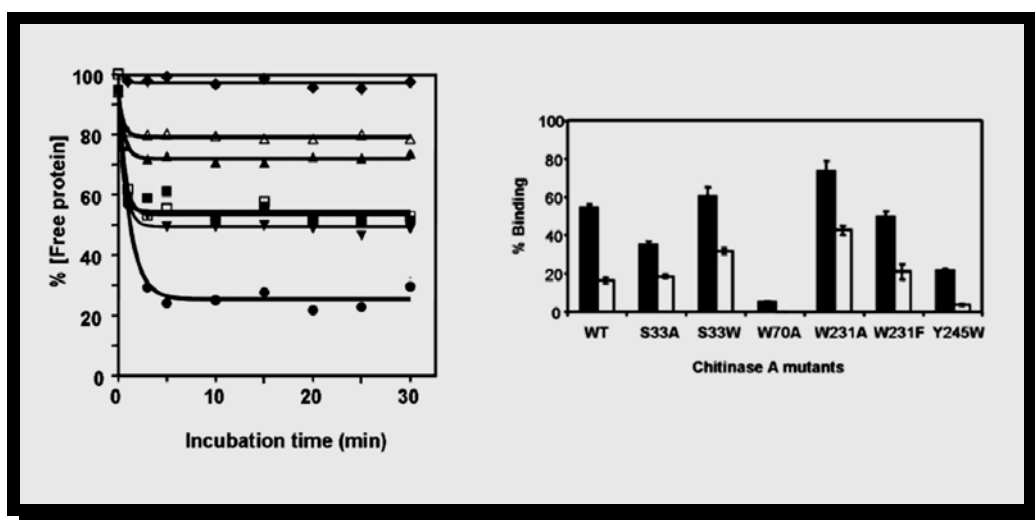
3.2. การศึกษาผลของการกลายพันธุ์ที่บริเวณจับกับไคติน

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]₂ crystalline chitin และ colloidal chitin ดังแสดงในตารางที่ 2 พบว่าการกลายพันธุ์มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่า hydrolytic activity ของ pNP สับสเตรทเพียงเล็กน้อย แต่พบว่าโปรตีนกลายพันธุ์ S33A W70A W231A และ W231F ให้ค่าแอกติวิตี้ต่อสับสเตรทสายยาวคือ colloidal chitin และ crystalline chitin ลดลงอย่างมาก เมื่อเทียบกับโปรตีนดั้งเดิม ส่วนโปรตีนกลายพันธุ์ S33W และ Y245W จะให้ค่าแอกติวิตี้สูงขึ้น

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

Protein	Specific hydrolyzing activity (U/ μ mol protein) ^a		
	Crystalline chitin	Colloidal chitin	pNP-[GlcNAc] ₂
Wild-type	0.59 $\pm$ 0.02 (100) ^b	12.9 $\pm$ 0.22 (100)	50.5 $\pm$ 1.13 (100)
S33A	n.d. ^c	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)

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

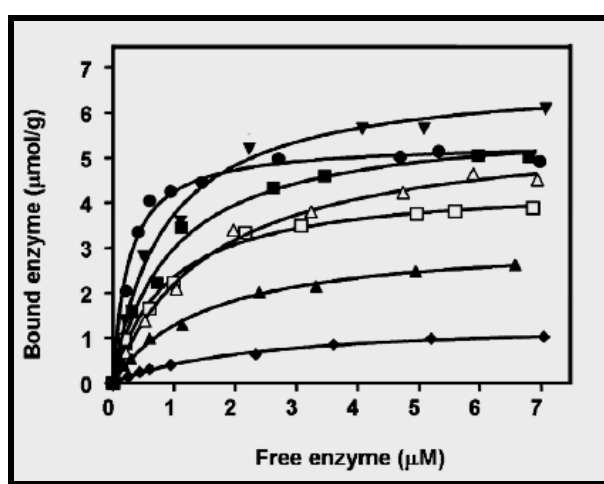
การศึกษาค่าทางจลนพลศาสตร์กับ chitohexamer กับ colloidal chitin พบว่าโปรตีนกลายพันธุ์ทุกตัวให้ ค่า K_m ต่อสับสเตรทไคโตโอลิโกแซคคารไรด์ลดลงเล็กน้อย และไม่มีผลอย่างมีนัยสำคัญกับค่า k_{cat} และค่า k_{cat}/K_m ของเอนไซม์ ในทางตรงข้ามกับโปรตีนกลายพันธุ์ S33A W70A W231A และ W231F ให้ค่า k_{cat} และค่า k_{cat}/K_m 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 ± 22.0	2.9	$1.3 \times 10^3 (100)^a$	1.74 ± 0.1	1.2	0.7 (100)
S33A	171 ± 20.5	2.6	$1.5 \times 10^3 (115)$	2.07 ± 0.2	0.9	0.4 (57)
S33W	210 ± 15.4	2.8	$1.3 \times 10^3 (100)$	1.58 ± 0.2	1.4	0.9 (129)
W70A	185 ± 22.0	2.5	$1.3 \times 10^3 (100)$	2.26 ± 0.4	0.4	0.2 (29)
W231A	189 ± 13.2	2.6	$1.4 \times 10^3 (108)$	1.01 ± 0.2	0.6	0.6 (86)
W231F	163 ± 10.3	2.4	$1.5 \times 10^3 (115)$	1.70 ± 0.2	0.9	0.5 (71)
Y245W	201 ± 13.1	2.6	$1.3 \times 10^3 (100)$	1.82 ± 0.2	1.7	0.9 (129)

^a Relative catalytic efficiencies (%) are shown in parentheses.

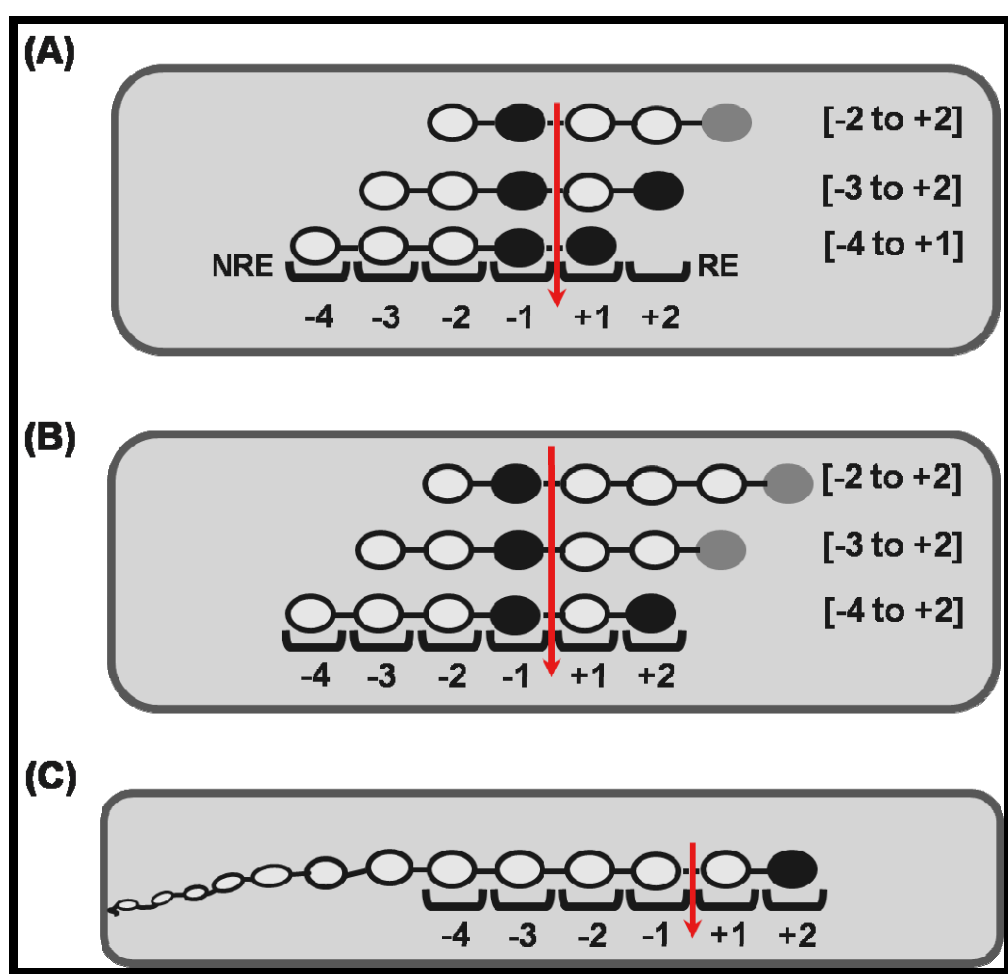
การศึกษาค่า adsorption isotherms พบว่า S33W และ W231A ให้ค่าการจับกับ colloidal chitin สูงกว่าโปรตีน wildtype ส่วน ไคติเนสกลายพันธุ์ W70A, S33A, W231F และ Y245W ให้ค่าการจับกับไคตินน้อยกว่า เมื่อคำนวณหาค่า dissociation binding constants (K_d) จากรูปที่ 8 ให้ค่า K_d ของ wild-type เป็น $0.95 \pm 0.11 \mu\text{M}$ 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. การศึกษากลไกการเลือกจับของสับสเตรทบนบริเวณเร่งและการเลือกใช้อิโนเมอร์ของ 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 ส่วนปลายด้านนอนรีดิวซ์ขยายมาทางด้านบริเวณ -4 และด้านโดเมน จับไคตินดังรูปที่ 9C

การศึกษาการย่อยที่เวลาเริ่มต้นที่ 0°C แล้วตรวจหาปริมาณของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นโดยเทคนิค quantitative HPLC ESI/MS พบว่าไคตินสตั้งเดิมย่อยสลายสเตรท pentaNAG จะถูกย่อยเป็นผลิตภัณฑ์สองชนิดคือ NAG₂ และ NAG₃ และย่อย hexaNAG ให้เป็น NAG₂, NAG₃ และ NAG₄ ซึ่งแสดงว่าการตัดพันธะ ไกลโคซิดิกเกิดขึ้นสองตำแหน่งคือ ตำแหน่งที่สองจากปลายสายและตำแหน่งกลางสายน้ำตาล ส่วนการประมาณเปอร์เซ็นต์ของปีต้าอะโนเมอร์ของผลิตภัณฑ์น้ำตาลที่ได้ได้แสดงไว้ในตารางที่ 4

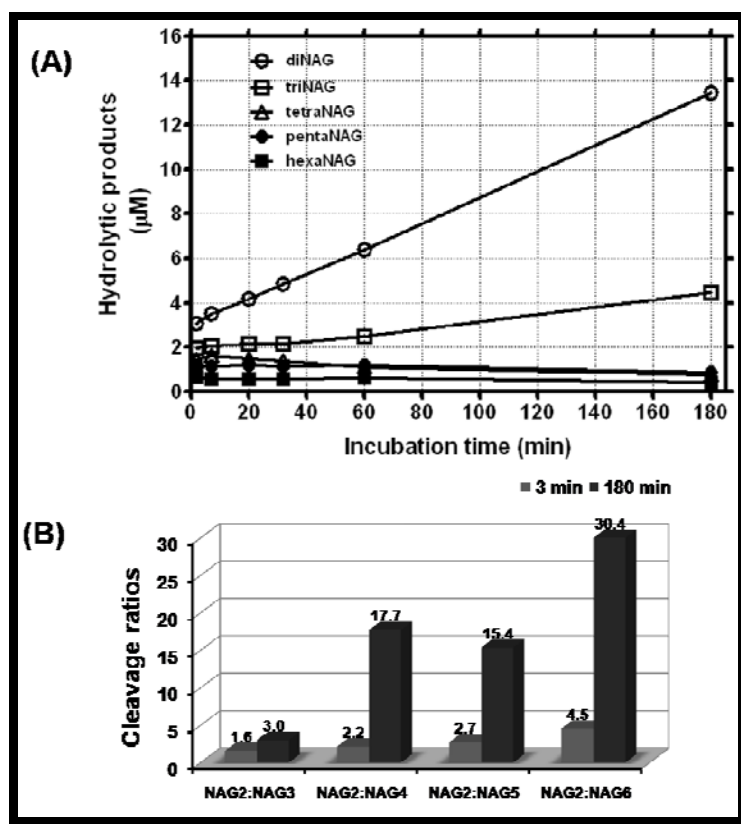
ตารางที่ 4 การประมาณผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการสลายไคโตโอลิโกแซคคาไรด์โดยวิธี quantitative HPLC MS analysis (แหล่งที่มา Suginta et al., J Chem Biol, 2009)

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

^aThe values in brackets are the expected values from the -2 to -2 binding mode for NAG5 hydrolysis.
^bThe values in brackets are the expected values from a combination of the -3 to +2 and -2 to +2 modes for NAG6 hydrolysis.

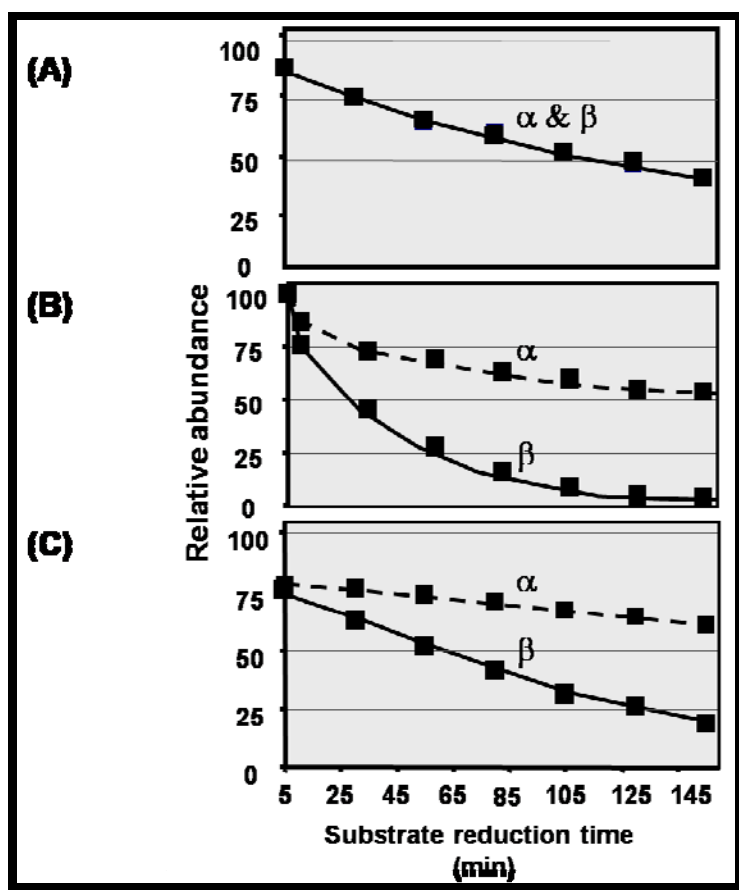
ผลการทดลองในตารางที่ 4 พบว่าเปอร์เซ็นต์การย่อย pentaNAG ด้วย wild-type chitinase ได้เป็น 92% β NAG₂ และ 41% β NAG₃ ซึ่งสอดคล้องกับเปอร์เซ็นต์คำนวณของผลิตภัณฑ์ (100% β NAG₂ และ 42% β NAG₃) ที่ได้จากการย่อยที่เกิดจากการจับของสับสเตรทโดยใช้ -2 to + 2 binding mode ส่วนเปอร์เซ็นต์การย่อย hexaNAG ได้เป็น 90% β NAG₂, 67% β NAG₃, และ 45% β NAG₄ สอดคล้องกับค่าคำนวณของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการจับของสับสเตรทโดยใช้กลไกแบบผสมระหว่าง -3 to +2 binding mode กับ -2 to +2 binding mode คือ 100% β NAG₂, 71% β NAG₃, และ 48% β NAG₄ ตามลำดับ (ตารางที่ 4 ค่าในวงเล็บ)

ส่วนผลของการสลายไคตินพบว่าเอนไซม์ไคตินเนสย่อยไคตินเป็นน้ำตาลไคโตโอลิโกแซ็กคาไรด์สายสั้น ๆ มีขนาดตั้งแต่ NAG-NAG₆ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่ได้ศึกษามาก่อนแล้วแต่ NAG₂ จัดเป็นผลิตภัณฑ์หลักของการย่อย โดยที่เวลาเริ่มต้นของการย่อย (3 นาที) เอนไซม์ผลิต NAG₂ ได้ประมาณ 3 μM และที่สิ้นสุดของปฏิกิริยาจะได้ NAG₂ ปริมาณ 13 μM ส่วนผลิตภัณฑ์รองลงมาคือ NAG₃ ที่ผลิตได้ในช่วงต้นคือ 2 μM และสิ้นสุดที่ 4 μM ส่วนผลิตภัณฑ์อื่นจัดเป็น intermediate ที่สร้างในปริมาณน้อย (น้อยกว่า 2 μM) ผลการทดลองที่ได้ยืนยันว่าเอนไซม์ไคตินเนสตัดสายไคตินในลักษณะผสมคือสายน้ำตาลสั้น ๆ ตั้งแต่ 3 หน่วยขึ้นไปเกิดจากการจับแบบ random binding และโดยการตัดด้วย endo activity ส่วนน้ำตาล NAG₂ เกือบทั้งหมดถูกสร้างโดยกลไกแบบ feeding โดยการตัดด้วย exo activity (รูปที่ 10A) เมื่อคำนวณค่า cleavage ratio ของน้ำตาล NAG₂ กับน้ำตาลผลิตภัณฑ์อื่น ๆ เทียบกันระหว่างเวลาที่ย่อยเริ่มต้นที่ 3 นาที กับเวลาสิ้นสุดในการทำปฏิกิริยาที่ 3 ชั่วโมงพบว่าสัดส่วนนี้ของ NAG₂ ต่อน้ำตาลชนิดต่าง ๆ มีค่าสูงขึ้นทั้งหมดกล่าวคือ NAG₂:NAG₃ สูงขึ้น 1.9 เท่า NAG₂:NAG₄ สูงขึ้น 9 เท่า NAG₂:NAG₅ สูงขึ้น 5 เท่า และ NAG₂:NAG₆ 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)

การทดลองต่อมาคือการศึกษากลไกของการกลายพันธุ์ต่อการเลือกใช้อะซิโนเมอร์ของสับสเตอร์ ดังแสดงในรูปที่ 11A พบว่าในช่วงเวลาในการทำปฏิกิริยาตั้งแต่ 0-150 นาที พบว่าอัตราการสลาย β -anomer ของสับสเตอร์ไม่แตกต่างจากอัตราการสลาย α -anomer ทั้งนี้แสดงให้เห็นว่าสับสเตอร์ น่าจะจับกับบริเวณเร่งของเอนไซม์โดยที่ปลายด้านรีดิวซ์ที่ยื่นออกมานอก substrate binding subsites และอยู่ในสภาวะละลายในโครงรูป β - หรือ α -anomer อยู่ในปริมาณสมดุล (48% β และ 52% α) ผลการทดลองสอดคล้องกับการจับของสับสเตอร์ 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 มีความสามารถในการใช้อะซิโนเมอร์ของสับสเตอร์เปลี่ยนไปกล่าวคือให้อัตราการสลาย β -anomer ได้ดีกว่า α -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 ส่งผลให้มีการเปลี่ยนการเลือกจับของเอนไซม์โดยมีการเลื่อนตำแหน่งของสายสับสเตอร์ไปทางด้านออกรีดิวซ์ได้เล็กน้อย จากตารางที่ 4 จะเห็นว่าการสลายน้ำตาล hexaNAG จะให้ผลิตภัณฑ์เป็น NAG_2 , NAG_3 และ NAG_4 เหมือนเดิมแต่เปอร์เซ็นต์ของ β content ที่ได้เปลี่ยนไปจากเดิมแสดงว่าสายน้ำตาลมีการเข้าจับที่บริเวณเร่งเปลี่ยนไป นอกจากนี้โปรตีนกลายพันธุ์ W275G ยังให้ค่าความจำเพาะต่อสับสเตอร์ (substrate specificity) ทั้งสามตัวคือ pentaNAG hexaNAG และ colloidal chitin ลดลงประมาณ 5 เท่า โดยมีการเปลี่ยนค่าความชอบในการจับ (affinity of binding, K_m) ต่อสับสเตอร์ 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-NAG₅ 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 (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{s}^{-1}\text{M}^{-1}$)	K_m (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{s}^{-1}\text{M}^{-1}$)	K_m (mg ml^{-1})	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{s}^{-1}\text{mg ml}^{-1}$)
Wild-type	380 ± 49 (1)	0.21 (1)	5.6×10^{-4} (1)	174 ± 23 (1)	0.19 (1)	1.1×10^{-4} (1)	12 ± 1.4 (1)	0.10 (1)	88×10^{-4} (1)
W275G	315 ± 110 (0.8)	0.04 (0.2)	1.3×10^{-4} (0.2)	238 ± 17 (1.4)	0.06 (0.3)	2.3×10^{-4} (2.1)	25 ± 3.7 (2.1)	0.02 (0.2)	6.7×10^{-4} (0.1)
W397F	476 ± 11 (1.3)	2.11 (10)	44×10^{-4} (8)	460 ± 53 (2.6)	3.0 (16)	65×10^{-4} (59)	19 ± 0.1 (1.6)	0.03 (0.3)	14×10^{-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 จากด้านนอนรีดิวซ์ (-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 NAG_5 และ NAG_6 โดยผลึกโปรตีนที่ได้สามารถหักเหรังสีเอ็กซ์ได้ดีในช่วง 2.0-1.7 อังสตรอม หลังจากเก็บข้อมูลและการหาโครงสร้างเบื้องต้นและโครงสร้างอย่างละเอียดโดยวิธี molecular replacement ขอได้ค่าทางสถิติและค่าการทำ refinement ของโครงสร้างสี่โครงสร้างคือ 1) wild-type; 2) E315M; 3) E315M+ NAG_5 ; และ 4) E315M+ 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 ₅	E315M+NAG ₆
Data collection statistics				
PDB code	3B8S	3B9E	3B9D	3B9A
Space group	P1	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
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 ^a (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)
Refinement statistics				
R_{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
R.M.S. deviations				
Bond length	0.007	0.006	0.006	0.006
Bond angle	0.968	0.932	0.962	0.990
Mean atomic				
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

^a Values in parentheses refer to the corresponding values of the highest resolution shell.

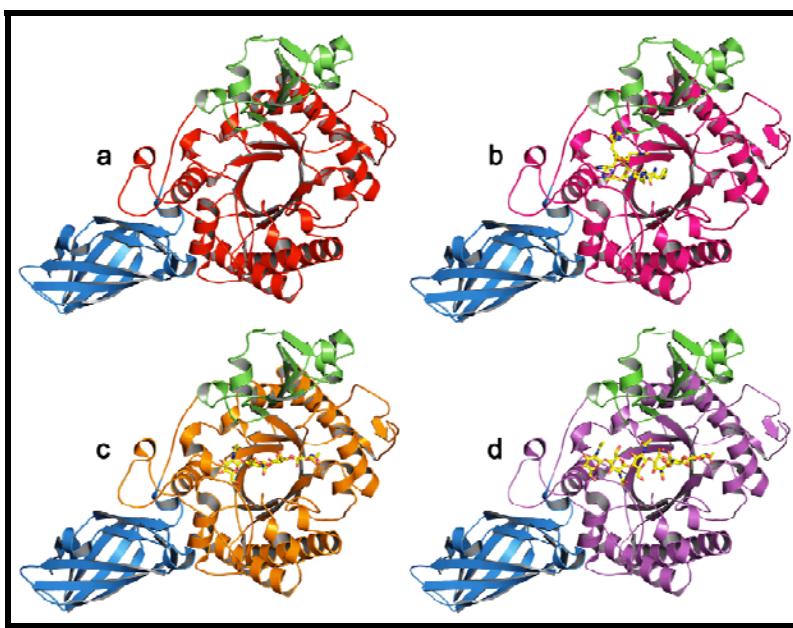
^b $R_{\text{merge}} = \frac{\sum_{hkl} \sum_i |I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle|}{\sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)}$ where I_i is the intensity for the i th measurement of an equivalent reflection with indices hkl .

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

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

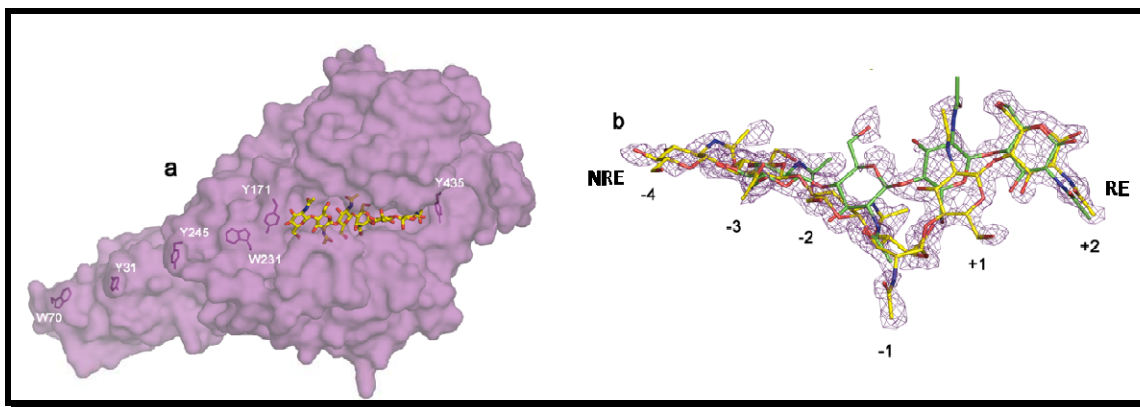
โครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ ไคตินเนส เอ จากเชื้อ *V. harveyi* ทั้งหมดสี่โครงสร้างคือ รูปที่ 12a เอนไซม์ไคตินเนส wild-type รูปที่ 12b โครงสร้างไคตินเนส เอ กลายพันธุ์ E315M ที่ไม่มีสับสเตรท พบกรดอะมิโน (His)₆ ด้าน C-terminus ของเอนไซม์ที่ทำ genetic engineering เข้าไปเพื่อช่วยในการทำบริสุทธิ์แบบจำเพาะฝังอยู่ที่บริเวณเร่งและจับกับกรดอะมิโนหลาย ๆ ตัวที่ทำหน้าที่จับกับสับสเตรท ส่วนรูปที่ 12c โครงสร้างเชิงซ้อนของไคตินเนส เอ กลายพันธุ์ E315M+NAG₅ พบโครงสร้างของน้ำตาล NAG₅ แบบสายตรงและพบหน่วยของน้ำตาลเพียงสี่หน่วย ส่วนน้ำตาลหน่วยสุดท้ายไม่สามารถหา electron density พบ คาดว่าน้ำตาลหน่วยนี้มีโครงสร้างที่ไม่ rigid แต่แกว่งไปแกว่งมาได้ ส่วนรูปที่ 12d แสดงโครงสร้างเชิงซ้อนของไคตินเนส เอ กลายพันธุ์ E315M+NAG₆ พบโครงรูปแบบของน้ำตาลทั้งหกหน่วยที่จับกับบริเวณ โครงสร้างทั่วไปของเอนไซม์ไคตินเนส เอ จากเชื้อ *V. harveyi* ประกอบด้วยสามโดเมนหลักคือ 1) โดเมนจับไคตินที่ปลายด้านเอ็น (the N-terminal chitin binding domain, ChBD) ประกอบด้วยกรดอะมิโนที่ 22-138 โดเมนนี้ประกอบด้วยสายปีต้าเป็นหลักและทำหน้าที่เกี่ยวกับการนำไคตินสายยาวเข้าสู่บริเวณเร่ง; 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 $\alpha+\beta$ ที่แทรกระหว่างโดเมนเร่งปฏิกิริยาของ 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 + NAG₅ (c) และสีม่วงสำหรับ E315M+NAG₆ (d) และโดเมนแทรกขนาดเล็ก (สีเขียว) (แหล่งที่มา Songsiriritthigul et al., J Struct Biol, 2008)

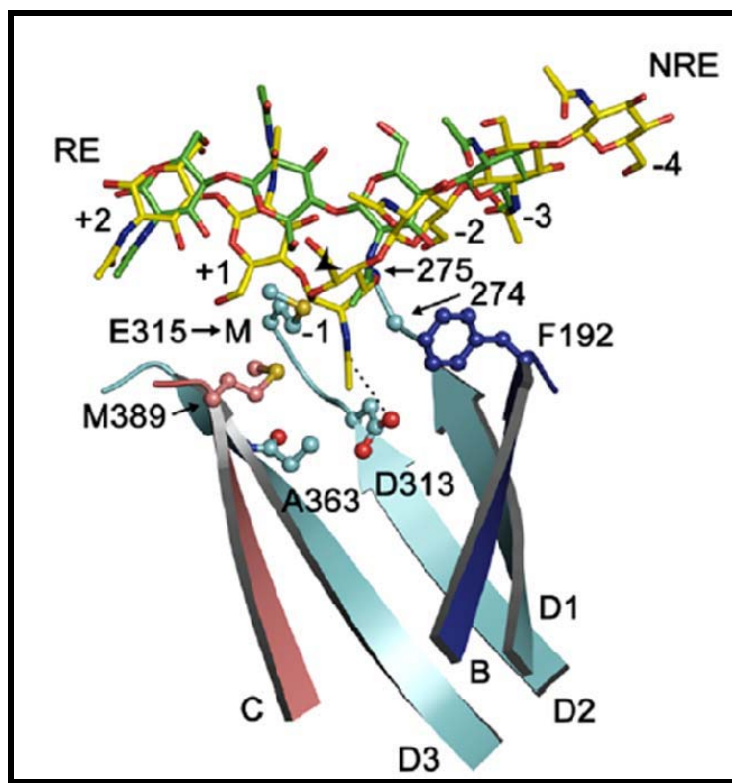
การวิเคราะห์โครงสร้างเชิงซ้อนของเอนไซม์ไคติเนส เอ กลายพันธุ์กับสับสเตรท NAG₆ (รูปที่ 13a,b) พบว่าบริเวณเร่งของเอนไซม์มีลักษณะยาวลึกประกอบด้วยบริเวณจับกับน้ำตาลทั้งหมดหกหน่วย โดยกำหนดบริเวณจับกับน้ำตาล GlcNAc แต่ละตำแหน่งเริ่มตำแหน่ง -4, -3, -2, -1, +1, +2 ตามลำดับ โดยที่ตำแหน่ง -4 อยู่ที่ด้านนอกบริเวณที่อยู่อันในของบริเวณเร่งส่วนตำแหน่ง +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)

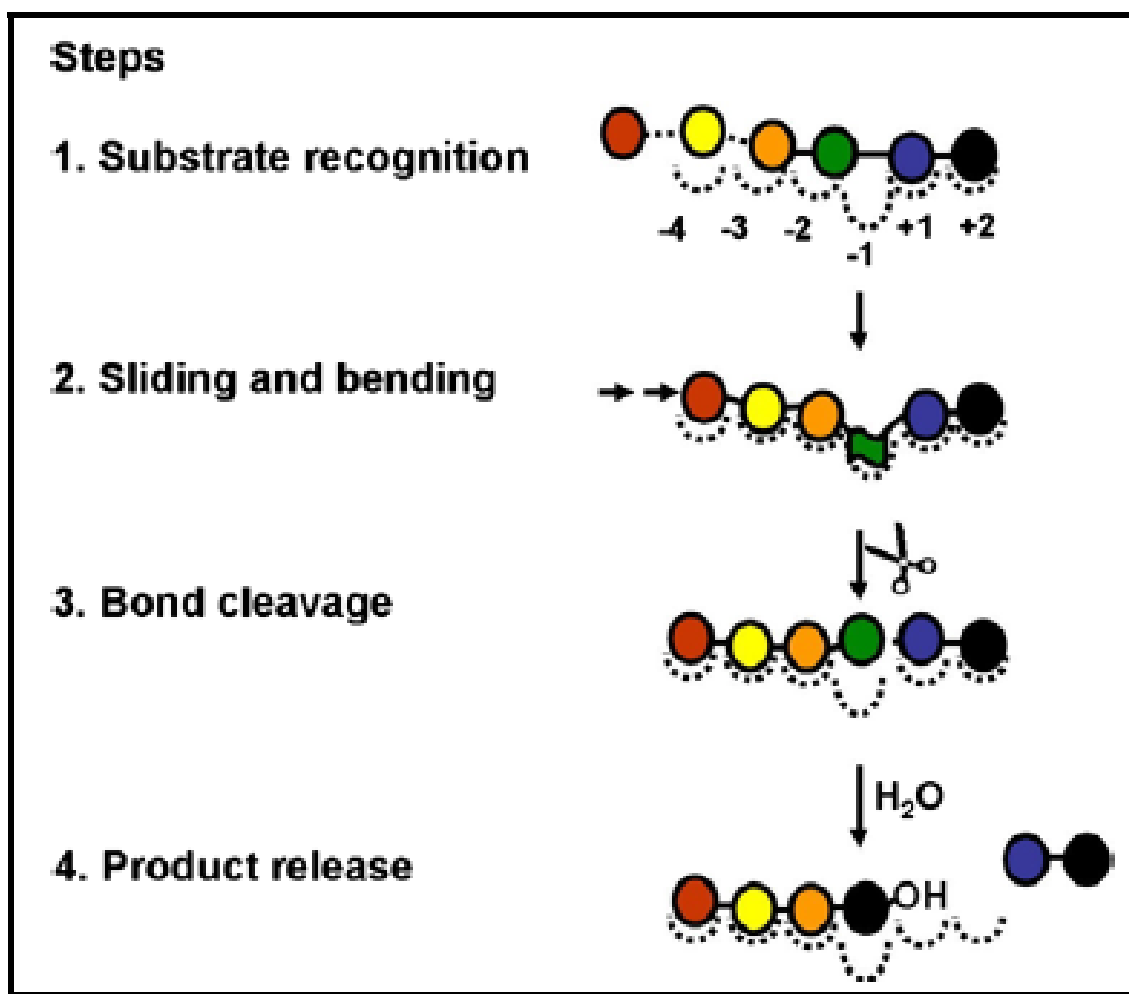
- (a) Surface representation แสดงลักษณะของบริเวณเร่งที่มีน้ำตาลหกหน่วยจับอยู่เต็มที่ (โครงสร้าง stick มีอะตอมของคาร์บอนแสดงด้วยสีเหลือง อะตอมของออกซิเจนแสดงด้วยสีแดง และอะตอมของไนโตรเจนแสดงด้วยสีน้ำเงิน) กรดอะมิโนวงแหวนที่เป็น surface exposed แสดงด้วยโครงสร้างแบบ stick (สีม่วง)
- (b) โครงสร้างของน้ำตาล NAG₅ เทียบกับ NAG₆ 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 NAG₅ จับในลักษณะโครงสร้างตรงและพบหน่วยน้ำตาลเพียงสี่หน่วยที่จับกับตำแหน่ง -3 -2 +1 และ +2 โดยไม่พบว่ามีน้ำตาลจับอยู่ที่ตำแหน่ง -1 เลย ส่วนน้ำตาล NAG₆ 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 ต่อมาน้ำตาลมีการเปลี่ยนโครงรูปเป็นรูปงอทำให้พันธะไกลโคซิดิกระหว่างน้ำตาล -1 กับ +1 เข้าไปใกล้กรดอะมิโนที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยา คือ Glu315 มากทำให้เกิดปฏิกิริยาการสลายพันธะผ่านกลไกการส่งโปรตอนได้ เรียกโครงรูปนี้ว่า bent conformation ผลการทดลองที่ได้จากการศึกษาโครงสร้างเชิงซ้อนของเอนไซม์ทำให้ทำนายกลไกการสลายโคตินของโคติเนส เอ ว่าจะเกิดผ่าน 'slide and bend' ซึ่งประกอบด้วย 4 ขั้นตอนดังแสดงในรูปที่ 15 ดังนี้



รูปที่ 15 กลไกการเร่งปฏิกิริยาตามข้อเสนอบแบบ 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) มีการเคลื่อนของสายน้ำตาลจากทางด้านบนรีดิวซ์ โดยปลายด้านรีดิวซ์ถูกตรึงด้วยกรดอะมิโนที่สำคัญต่อการเลือกจับของสับสเตรทสองตัวคือ 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 β สับสเตรทมากกว่า α 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*. 3rd Annual Symposium of the Protein Society of Thailand “Frontiers in Protein Research”, Chulabhorn Research Institute Conference Center, Bangkok, August 28th-29th, 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. 3rd Annual Symposium of the Protein Society of Thailand “Frontiers in Protein Research”, Chulabhorn Research Institute Conference Center, Bangkok, August 28th-29th, 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. 3rd Annual Symposium of the Protein Society of Thailand “Frontiers in Protein Research”, Chulabhorn Research Institute Conference Center, Bangkok, August 28th-29th, 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. 2nd Annual Symposium of the Protein Society of Thailand “Odysseys in Protein Research”, Chulabhorn Research Institute Conference Center, Bangkok, September 20th-21st, 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. 2nd Annual Symposium of the Protein Society of Thailand “Odysseys in Protein Research”, Chulabhorn Research Institute Conference Center, Bangkok, September 20th-21st, 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. 2nd

- Annual Symposium of the Protein Society of Thailand “Odysseys in Protein Research”, Chulabhorn Reserch Institute Conference Center, Bangkok, September 20th-21st, 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. 1st Annual Symposium of the Protein Society of Thailand “Challenges in Protein Research in Thailand”, Chulabhorn Reserch Institute Conference Center, Bangkok, October 24-25th, 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. 1st Annual Symposium of the Protein Society of Thailand “Challenges in Protein Research in Thailand”, Chulabhorn Reserch Institute Conference Center, Bangkok, October 24-25th, 2006. P19. *Oral presentation*.
 9. Songsiriritthigul C, Aguda A, Robinson RC & **Suginta W**. Structure of chitinase A from *Vibrio carchariae*. 2nd 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*. 2nd Protein Symposium Network, Chulabhorn Research Institute, Bangkok, Thailand, September 23th-24th, 2005. *Invited oral presentation*.
 11. Songsiriritthigul C, Vongsuwan A, Krittanai C & **Suginta W** A study of substrate specificity of chitinases A from *Vibrio carchariae*. 31st 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^{a,*}, Chomphunuch Songsiriritthigul^{a,b}, Archara Kobdaj^a,
Rodjana Opassiri^a, Jisnusun Svasti^c

^a School of Biochemistry, Institute of Science, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima 30000, Thailand

^b National Synchrotron Research Center, P.O. Box 93, Nakhon Ratchasima 30000, Thailand

^c 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]₂ 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_m* and *k_{cat}* 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_r* 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 β (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]₂ or

G2) as the main products. Chitobioses (EC 3.2.1.52 or formally EC 3.2.1.30) and *N*-acetyl- β -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, β -1–4 linked oligomers of GlcNAc residues where *n*=1–6; *p*NP-(GlcNAc)₂, 4-nitrophenyl *N,N'*-diacetyl- β -D-chitobioside; TLC, thin-layer chromatography; DMAB, *p*-dimethylaminobenzaldehyde; IPTG, isopropyl thio- β -D-galactoside; PMSF, phenylmethylsulphonylfluoride

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

E-mail address: 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 β_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 β over α 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 α 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 60F₂₅₄, 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). 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 ^a
W168G	<i>Chitinase A</i> wild-type	forward 5'-CTTATTTTGTGAAGGAGGCATCTACGG-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'

^a 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)₆ sequence [10]. For recombinant expression, the cells were grown at 37 °C in Luria Bertani (LB) medium containing 100 µg/ml ampicillin until OD₆₀₀ 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_r* 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]₂ 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)₂ (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 Na₂CO₃. 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*₅₈₅). Specific hydrolyzing activity against colloidal chitin was calculated by converting *A*₅₈₅ 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 cm² d/mol, *n* is the number of amino acids in the polypeptide chain, *m*[°] 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 μ l), containing 0–500 μ M *p*NP-(GlcNAc)₂, dissolved in 100 mM sodium acetate buffer, pH 5.0, and dH₂O, 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 μ l of 1 M Na₂CO₃. Release of *p*-nitrophenol (*p*NP) was monitored at A_{405} , which was subsequently converted to molar quantities using a calibration curve of *p*NP (0–30 nmol). The kinetic values (K_m , V_{max} , and k_{cat}) 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 dH₂O 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 μ 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- μ 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_{280}).

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- μ 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 μ 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: H₂O (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- μ l reaction mixture, containing 0.1 M sodium acetate buffer, pH 5.0, 20 mg colloidal chitin, and 80 μ 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

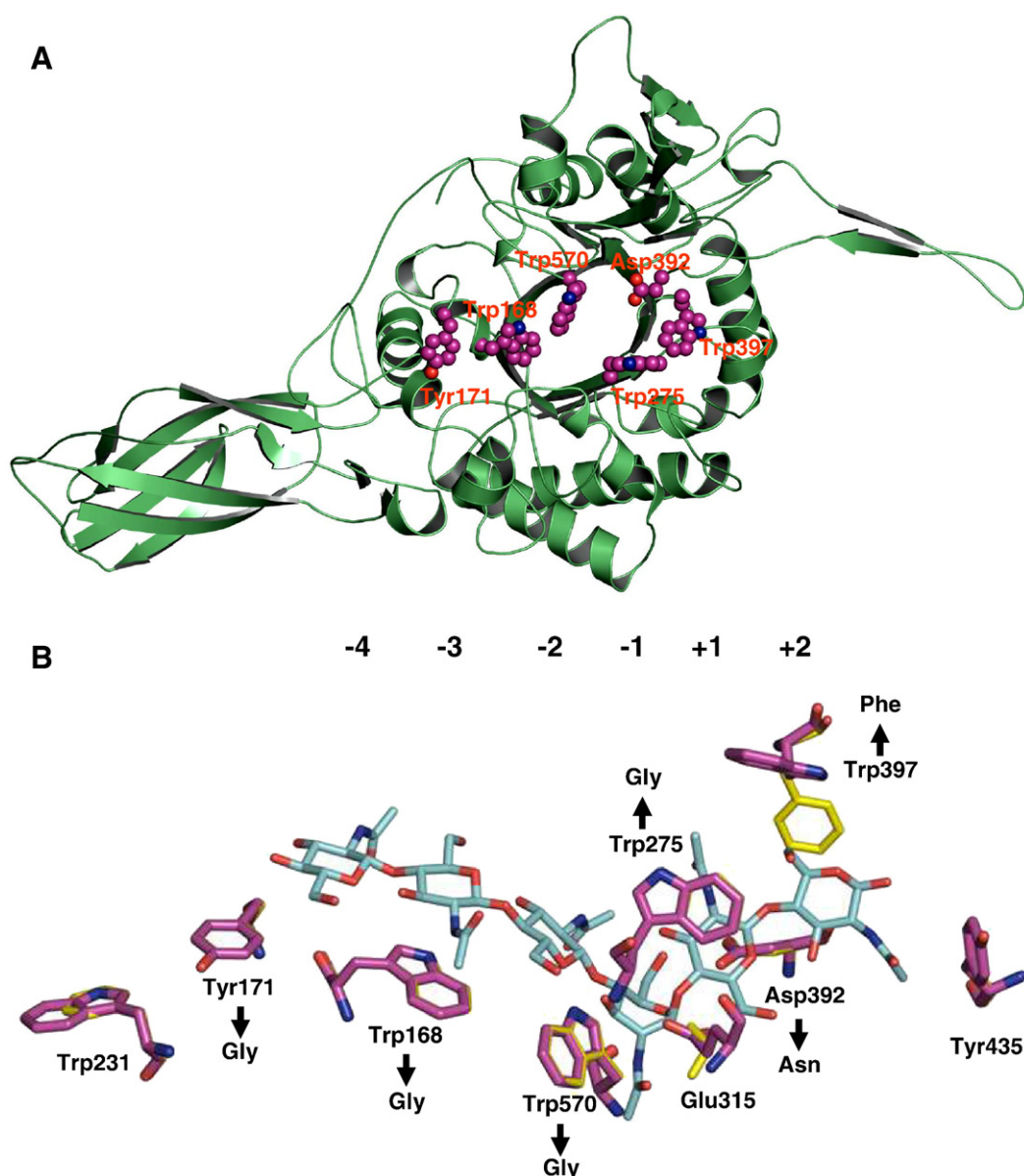


Fig. 1. The Swiss-Model 3D-structure of *V. carchariae* chitinase A. (A) A ribbon representation of the 3D-structure of *V. carchariae* chitinase A (in green) was modeled based on the X-ray structure of *S. marcescens* Chi A E315L mutant as described in the text. The target aromatic residues (in magenta) 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]₂ and colloidal chitin were examined (Table 2), similar results were seen

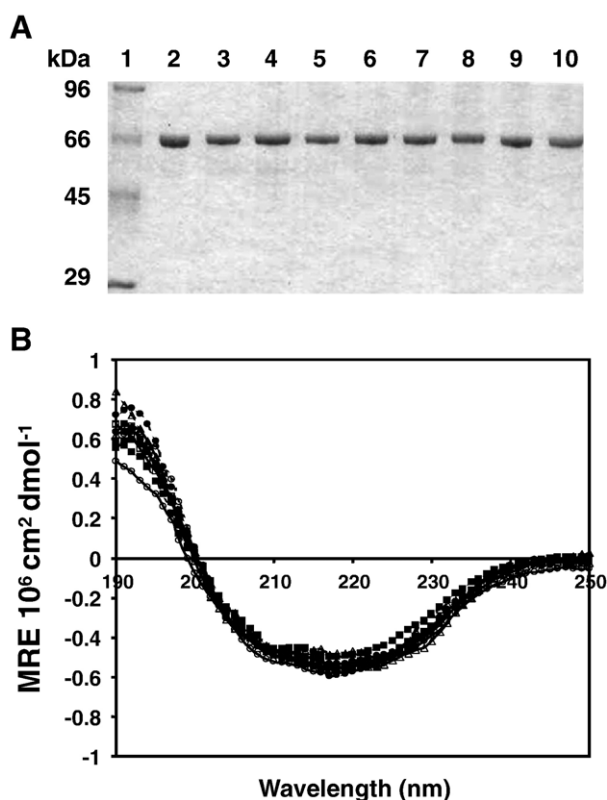


Fig. 2. SDS / PAGE analysis and CD spectra of chitinase A variants. (A) Purified chitinases (2 μ g) were electrophoresed using 12% SDS/PAGE gel and then were stained with Coomassie blue. (B) Chitinase A and its mutants were purified by Ni-NTA agarose affinity chromatography, and then dialyzed extensively 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.

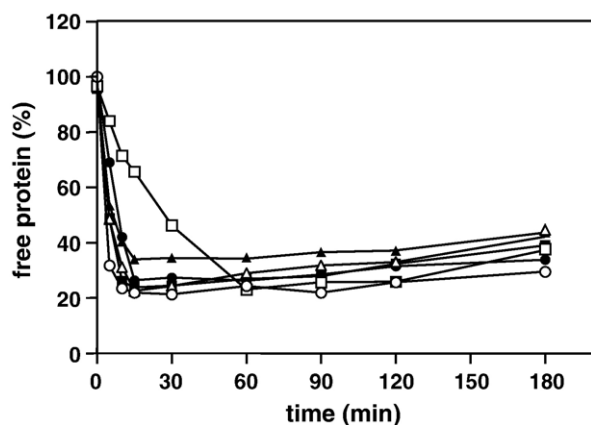


Fig. 3. Time-course studies of binding of chitinase A and mutant enzymes to colloidal chitin. Chitinases (200 μ g/ml in 100 mM sodium acetate buffer, pH 5.0) were incubated with 2.5 mg/ml flake chitin at 4 °C to minimize chitin hydrolysis. Decreases in free enzyme concentration were monitored at different 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]₂ and colloidal chitin

Chitinase A variant	Specific hydrolyzing activity	
	($\times 10^{-3}$ μ mol <i>p</i> NP/min/ μ g) ^a	(μ mol reducing sugars/min/ μ g) ^b
Wild-type	1.84 $\pm$ 0.05 (100) ^c	1.99 $\pm$ 0.018 (100)
D392N	0.61 $\pm$ 0.09 (33.4)	n.d. ^d
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- μ l assay mixture, containing 400 ng chitinase, 500 μ M *p*NP-(GlcNAc)₂, 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 μ l of 1.0 M Na₂CO₃. The amount of *p*NP released was determined by A_{405} . The μ 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 μ l), containing 20 mg of colloidal chitin, 0.1 M sodium acetate buffer, pH 5.0 and 80 μ 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 μ mol amounts of the reducing sugars were estimated using a standard calibration curve of G2 (0–4.0 μ mol).

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

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

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

^d 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 β -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]₂ 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]₂. In the modeled 3D structure (see

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

Chitinase A variants	K_m^a (μ M)	V_{max} (nmol/min/ μ g chitinase)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($s^{-1} M^{-1}$)
Wild-type	288 $\pm$ 26.0	1.94 $\pm$ 0.09	2.15	7.16 $\times 10^2$ (100) ^b
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]₂ at varying concentrations of 0–500 μ 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 μ l of 1 M Na₂CO₃. Release of *p*NP, monitored at A₄₀₅, was converted to molar quantities using a calibration curve of *p*NP (0–30 nmol). The kinetic values (K_m , V_{max} , and k_{cat}) were determined by nonlinear regression using GraphPad Prism software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA).

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

^b Numbers in brackets reveal relative k_{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]₂ 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]₂. 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]₂

The kinetic parameters of the hydrolytic activity of wild-type and its single mutants (except for W570G) were further explored with *p*NP-[GlcNAc]₂. As shown in Table 3, the active-site modifications resulted in impairment of both K_m and k_{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_{cat} values to 5–14% of that of the wild-type. Overall, the mutations varied the k_{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]₂. Its K_m and k_{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

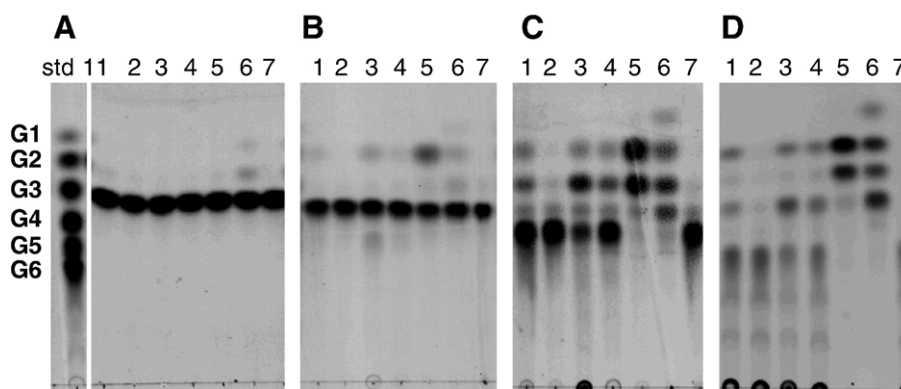


Fig. 4. TLC analysis of chitoooligosaccharide hydrolysis of chitinase A and mutants. A reaction mixture, containing 400 ng chitinase and 2.5 mM substrate (G2–G6) in 100 mM sodium acetate buffer, pH 5.0, was incubated for 60 min at 30 °C. After boiling, the reaction solution (5 μ l) was analyzed on TLC 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.

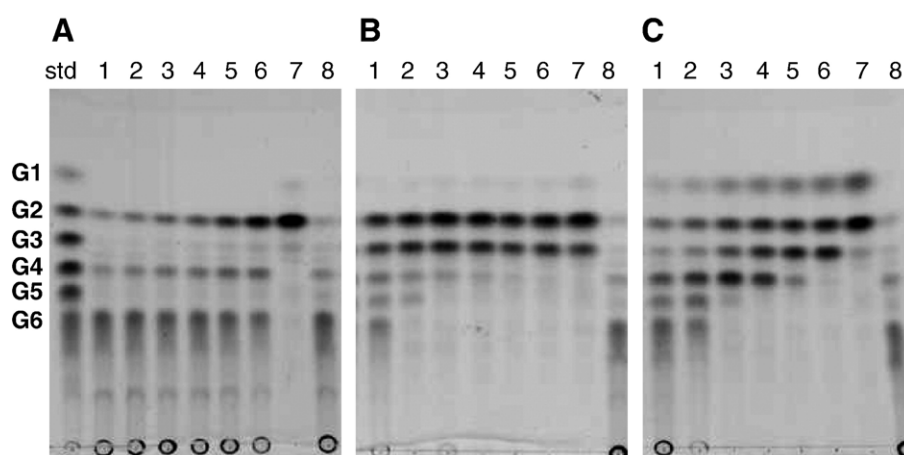


Fig. 5. Time-course of G6 hydrolysis by wild-type and mutants W275G and W397F. A reaction mixture (80 μ l), containing 800 ng wild-type (A), W275G (B), or W397F (C) and 2.5 mM G6 in 0.1 M sodium acetate buffer, pH 5.0, was incubated at various times at 30 $^{\circ}$ C, and then analyzed by TLC. Sugar 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).

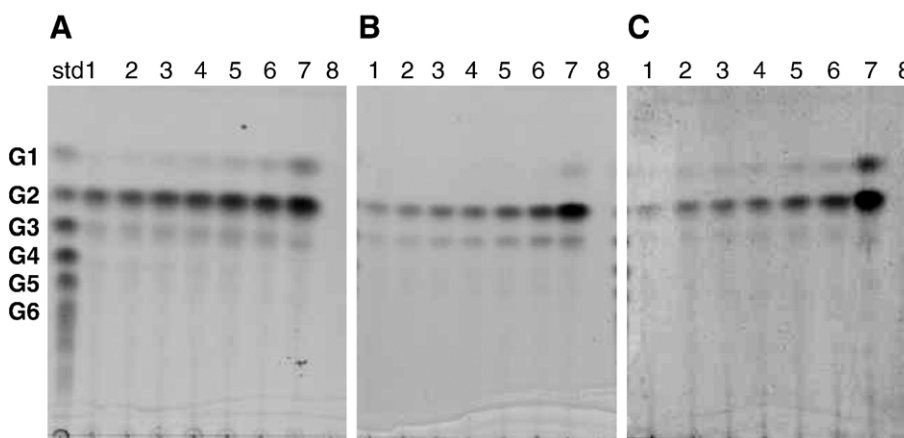


Fig. 6. Time-course of colloidal chitin hydrolysis by wild-type and mutants W275G and W397F. A reaction mixture (400 μ l), containing 80 μ g wild-type (A), W275G (B), or W397F (C) and 20 mg colloidal chitin in 0.1 M sodium acetate buffer, pH 5.0, was incubated at various times at 30 $^{\circ}$ C, and 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.