

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : TRG45-8-0058
ชื่อโครงการ : การศึกษาโครงสร้างและหน้าที่ของเอนไซม์ไคติเนส เอ จากเชื้อ *Vibrio carchariae*: การนำผลผลิตจากการย่อยสลายไคติโนโดยขบวนการชีวภาพมาใช้ประโยชน์ทางการแพทย์
ชื่อนักวิจัย : วิภา สุจินต์
สาขาวิชาชีวเคมี สำนักวิชาวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
E-mail Address : vipa@ccs.sut.ac.th
ระยะเวลาโครงการ : กรกฎาคม 2545 – มิถุนายน 2547

งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาคูณสมบัติของเอนไซม์ไคติเนส เอ ที่ผลิตจากเชื้อแบคทีเรียในทะเลคือเชื้อ *Vibrio carchariae*: โดยใช้เทคนิค HPLC-ESI MS เทคนิคนี้สามารถแยกผลผลิตที่ได้จากการสลายไคติโนและไคติโอไลโกแซคคาร์ไรด์ที่มีขนาดต่าง ๆ กันได้พร้อมกัน โดยผลผลิตที่ได้ให้โครงสร้างแบบบีต้าก่อนอัลฟาสนับสนุนกลไกแบบ “retaining mechanism” เอนไซม์สามารถใช้สารตั้งต้นขนาดเล็กที่สุดคือไตรเมอร์และผลผลิตหลักของปฏิกิริยาคือ [GlcNAc]₂ การศึกษาคูณสมบัติทางจลศาสตร์ของเอนไซม์โดยทดสอบกับสารตั้งต้นชนิดต่าง ๆ พบว่าเอนไซม์มีความชอบต่อสารตั้งต้นมากขึ้นเมื่อความยาวของหน่วย GlcNAc เพิ่มขึ้น ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับข้อสรุปที่ว่าเอนไซม์มีตำแหน่งจับกับหน่วย GlcNAc บนไคติโนโพลีเมอร์มากกว่า 4 ตำแหน่ง การศึกษาคูณสมบัติของเอนไซม์ในการสังเคราะห์โอลิโกแซคคาร์ไรด์จากหน่วยย่อยขนาดเล็ก ภายใต้สภาวะที่ทดสอบโดยใช้ pNP-[GlcNAc]₂ เป็นสารตั้งต้นพบว่าเอนไซม์สามารถสังเคราะห์ [GlcNAc]₃ และ [GlcNAc]₄ เป็นผลผลิตหลัก การวิเคราะห์มวลของเพปไทด์ของเอนไซม์ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซินโดยเครื่อง MALDI-TOF MS และ nanoESI MS พบว่าตรงกับมวลของเพปไทด์ที่คำนวณได้จากลำดับกรดอะมิโนของโพลีเพปไทด์ที่แปลรหัสจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไคติเนส เอ การทำนายโครงสร้างทุติยภูมิพบว่าเอนไซม์ไคติเนส เอ มีโครงสร้างคล้ายคลึงกับโครงสร้างของ Chi A จากเชื้อแบคทีเรีย *Serratia marcescens* โดยประกอบด้วยสามโดเมนหลัก โดเมนที่ 1 คือ N-terminal chitin binding domain ต่ออยู่กับส่วน hinge สั้น ๆ ที่เชื่อมกับโดเมนที่ 2 คือ catalytic (α/β)₈ TIM barrel domain ประกอบด้วยเกลียวอัลฟาและสายบีต้าอย่างละ 8 สาย โดเมนนี้ถูกคั่นด้วยโดเมนที่ 3 คือ Small insertion domain ผลการทดลองที่ผ่านมาพบว่ายีนไคติเนส เอ ที่แยกจากจีโนมของเชื้อ *Vibrio carchariae* ถอดรหัสให้กรดอะมิโน 850 ตัวได้สายโพลีเพปไทด์ต้นตอมี

$M_r = 95,000$ แต่มวลโมเลกุลของเอนไซม์ที่ผลิตโดยเชื้อแบคทีเรียที่ได้จากการวิเคราะห์โดยวิธี MALDI-TOF MS ให้ค่า $M_r = 62,698$ แสดงว่าโปรตีนตั้งตอที่สร้างขึ้นภายในเซลล์ของแบคทีเรียนี้ ถูกย่อยด้วยเอนไซม์โปรติเอสให้มีขนาดเล็กลงจึงจะทำงานได้ โดยได้ทำนายตำแหน่งย่อยอยู่ระหว่างกรดอะมิโน Arg597-Lys598 ผลการทดลองนี้นำไปสู่การออกแบบไพรเมอร์เพื่อการโคลน ยีนไคติเนส เอ ที่ทำงานได้และได้ทดสอบการแสดงออกของยีนในระบบ QIAExpress ในเชื้อ *E. coli* M15 พบว่าริคอมบิแนนท์โปรตีนที่ผลิตได้มีน้ำหนักโมเลกุล 63 kDa และมีกรดอะมิโนอีทีดินติดอยู่ 6 ตัวที่ ด้านปลายคาร์บอกซี ไคติเนสที่สร้างขึ้นมีความสามารถในการย่อย glycol-chitin และ colloidal chitin ได้ดี การทดสอบการตกผลึกโปรตีนพบว่าริคอมบิแนนท์ไคติเนส เอ สามารถเกิด ผลึกได้ที่อุณหภูมิ 15°C ที่สภาวะบัฟเฟอร์คือ 0.1 M โซเดียม อะซิเตท พีเอช 4.6 ที่มี 10% PEG 400 และ 0.125 M CaCl_2 เป็นองค์ประกอบ การวิเคราะห์ทางโครงสร้างเบื้องต้นพบว่าผลึกโปรตีน ให้ค่าการหักเหของรังสีเอกซ์ โดยมีค่า resolution = 2.14 Å ความสมบูรณ์ของข้อมูล = 97.2% มี space group เป็นเตตระโกนอล แบบ $\{4_122$, หรือ $P4_322$ และมีค่าหน่วยเซลล์คือ $a = 127.64$ $b = 127.64$ และ $c = 171.42$ Å

คำหลัก: chitinase chitinase A, *Vibrio carchariae*, cloning, expression, and chitin hydrolysis

Abstract

Project Cord : TRG45-8-0058

Project Title : Functional and structural Characterisation of *Vibrio carchariae*:
Medical Application from Bioconversion of Chitin

Investigator : Suginta W.
School of Biochemistry , Institute of Science ,
Suranaree University of Technology

E-mail address : wipa@ccs.sut.ac.th

Project Period : July 2002 – July 2004

The enzymic properties of chitinase A from a marine bacterium, *V. carchariae*, were studied using HPLC and electrospray MS. This combination allowed separation of α - and β - anomers and simultaneous monitoring of all chitooligosaccharides produced. Chitinase A primarily produced β -anomeric products, indicating that it catalysed hydrolysis through a retaining mechanism. The enzyme required a minimum of two glycosidic bonds for hydrolysis, producing (GlcNAc)₂ as the major end products. The kinetics of the hydrolytic activity of chitinase A were determined with various chitooligosaccharid substrates and showed a greater affinity towards higher molecular weight chitooligosaccharides. The subsite structure of *V. carchariae* chitinase A was compatible with >4 GlcNAc subsites. The enzyme also catalysed transglycosylation reactions. Under given conditions, the synthetic products (GlcNAc)₃ and (GlcNAc)₄ were observed when using pNP-(GlcNAc)₂ as substrate. Peptide masses of the native enzyme identified from MALDI-TOF or nanoESIMS were identical with the putative amino acid sequence translated from the corresponding nucleotide sequence of *V. carchariae* chitinase A. The topology of the secondary structure was predicted to be similar to the structure of SmChiA. Overall, the structure contained three domains: an *N*-terminal chitin binding domain connected with a small hinge region, a (α/β)₈ TIM barrel catalytic domain and a small insertion domain. My previous results showed that the full-length *chitinase A* gene encoded 850 amino acids, giving an expressed chitinase A Precursor of *Mr* 95,000. MALDI-TOF MS revealed the *Mr* of the native enzyme to be 62,698, suggesting the C-terminal proteolytic cleavage site to be located between

Arg597-Lys598. As a result, it allowed the DNA fragment that encodes the mature chitinase A to be generated *in vitro* and subsequently cloned into a QIAexpress expression system and *E. coli* M15. The expressed 63-kDa protein, containing six histidine residues tagged at the C-terminus, exhibited chitinase activity on a gel activity assay. As revealed by HPLC-MS, the expressed proteins showed identical characteristics in chitin hydrolysis with the native enzyme. Crystallisation trials showed that the recombinant chitinase A could form crystals under a crystallisation buffer containing 0.1 M sodium acetate buffer, pH 4.6 containing 10% PEG 400 and 0.125 M CaCl_2 as precipitant and at 15° C. Preliminary structural analysis revealed that the crystal diffracted X-rays up to 2.14 Å resolution with 97.2% completeness and belonged to the tetragonal space group $P4_122$, or $P4_322$ with unit-cell parameters $a = 127.64$, $b = 127.64$, $c = 171.42$ Å.

Key words : chitinase A, *Vibrio carchariae*, cloning, expression, and chitin hydrolysis