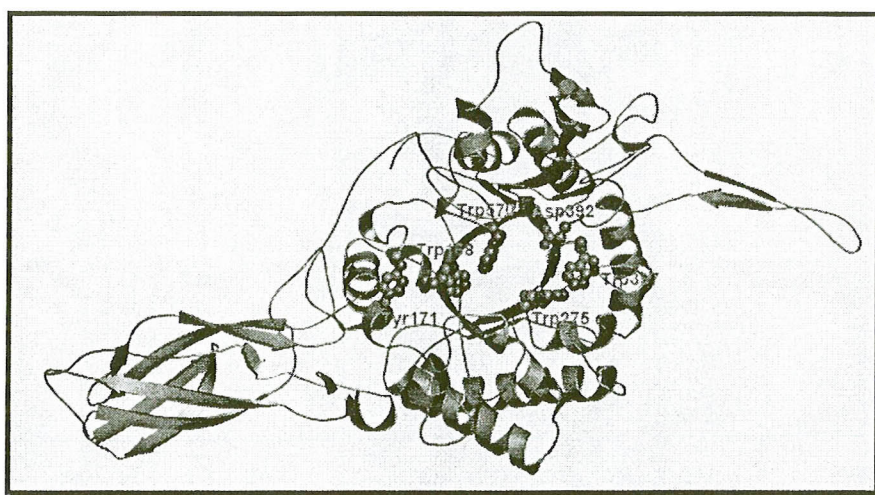


บทที่ 3

ผลการวิจัยและข้อวิจารณ์

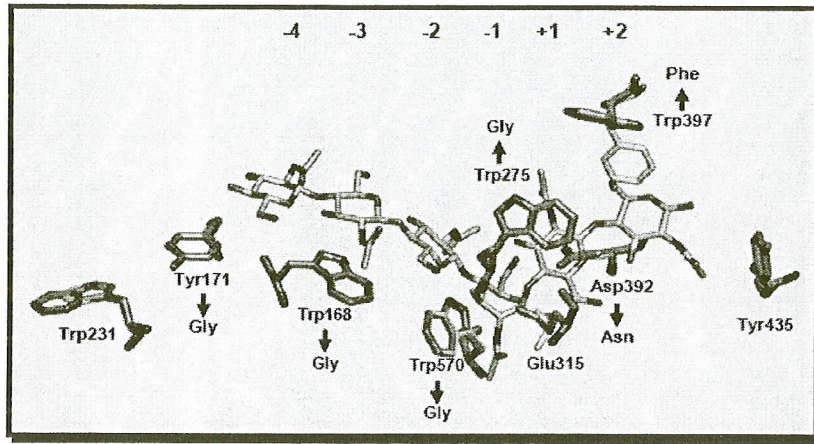
3.1. การศึกษาผลของการกลายพันธุ์ของกรดอะมิโนที่บริเวณเร่ง

งานวิจัยเริ่มต้นที่ทำการออกแบบสังเคราะห์ mutagenic primer เพื่อทำการเปลี่ยนกรดอะมิโนวงแหวนที่บริเวณเร่งของเอนไซม์ไคติเนส เอ ทั้งหมด Trp168 Tyr171 Trp275 Trp397 และ Trp570 จากการเปรียบเทียบลำดับของกรดอะมิโนของเอนไซม์นี้กับไคติเนสจากแบคทีเรียอื่น ๆ และจากแบบจำลองโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ไคติเนสที่ใช้โครงสร้างสามมิติของไคติเนส เอ จากเชื้อ *Serratia marcescens* เป็นต้นแบบพบว่ากรดอะมิโนทั้งหมดนี้มีลักษณะ conserved และมีการจัดเรียงตัวอยู่ที่ส่วนบนของ TIM barrel domain ดังแสดงในรูปที่ 3.1



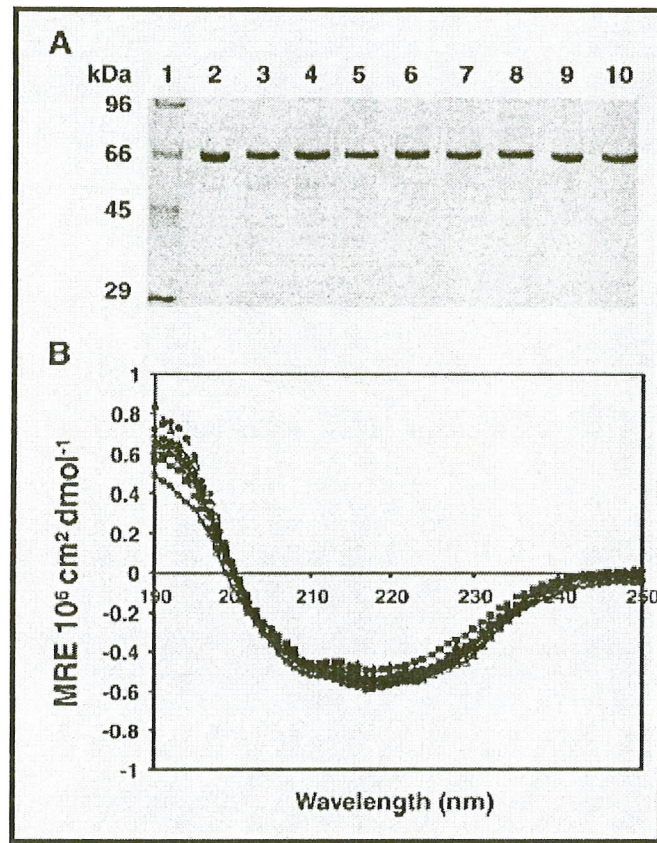
รูปที่ 3.1 แบบจำลองโครงสร้างสามมิติของไคติเนส เอ จากแบคทีเรีย *V. carchariae* ที่แสดงตำแหน่งของกรดอะมิโนวงแหวน Trp168 Tyr171 Trp275 Trp397 และ Trp570 ที่บริเวณด้านบนของ TIM barrel domain (แหล่งที่มา Suginta et al., BBA-General Subjects, 2007)

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 3.2



รูปที่ 3.2 การจัดเรียงตัวของกรดอะมิโนในวงแหวนที่บริเวณเร่งของไคติเนส 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 3.3.A) และปริมาณของโปรตีนที่ผลิตได้คือ 10-15 mg โปรตีนบริสุทธิ์ต่อเซลล์ 1 ลิตร การวิเคราะห์โครงสร้างระดับทุติยภูมิด้วย CD spectroscopy พบว่าลักษณะของ CD spectra ของโปรตีนกลายพันธุ์มีความคล้ายคลึงกับของโปรตีน wild-type (รูปที่ 3.3B) แสดงว่ากรดอะมิโนที่ได้ทำการเปลี่ยนแปลงไม่ส่งผลกระทบต่อโครงสร้างโดยรวมของโปรตีน



รูปที่ 3.3 การวิเคราะห์เอนไซม์ไคติเนส เอ หลังทำการกลายพันธุ์

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

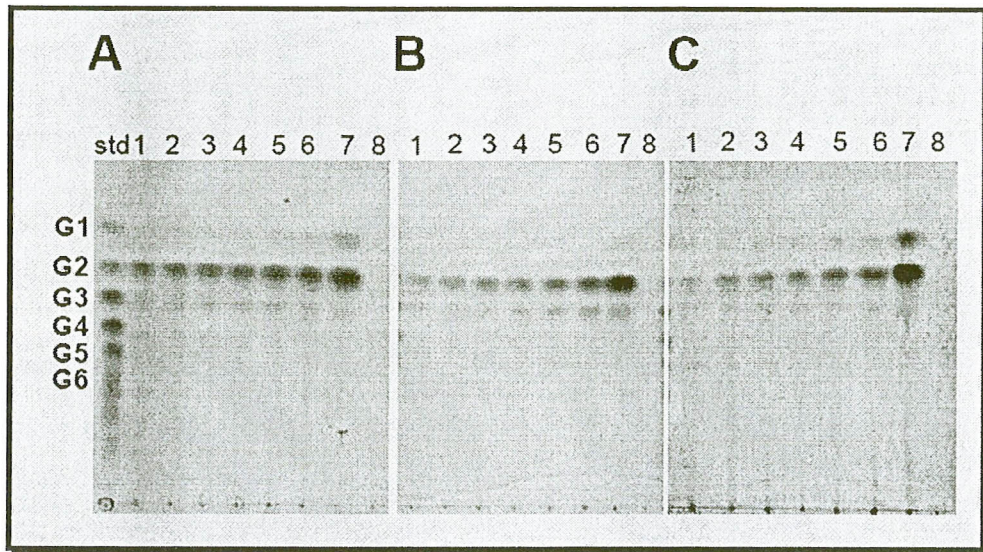
การตรวจหาค่า specific hydrolyzing activity ของเอนไซม์กลายพันธุ์เทียบกับเอนไซม์ wild-type โดยดูการสลายของ pNP-GlcNAc₂ และ colloidal chitin พบว่าโปรตีนกลายพันธุ์ทั้งหมดยกเว้น W397F ให้ค่า specific activity ต่ำกว่าค่าของโปรตีน wild-type ส่วน W397F ให้ค่า specific activity ของการสลาย pNP-GlcNAc₂ สูงเป็น 142 เท่าและให้ค่าที่ไม่แตกต่างกันในสลาย colloidal chitin ของค่าที่ได้จาก wild-type (ตารางที่ 3.1)

ตารางที่ 3.1 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 ± 0.05 (100) ^c	1.99 ± 0.018 (100)
D392N	0.61 ± 0.09 (33.4)	n.d. ^d
W168G	0.24 ± 0.03 (13.0)	n.d.
Y171G	0.36 ± 0.00 (19.5)	n.d.
W275G	0.20 ± 0.00 (11.1)	0.10 ± 0.001 (5.0)
W397F	2.61 ± 0.08 (141.8)	2.04 ± 0.061 (102.5)
W570G	0.11 ± 0.00 (5.6)	n.d.
Double mutant (W570G/W397F)	0.10 ± 0.002 (5.5)	n.d.
Triple mutant (W570G/W397F/W275G)	0.01 ± 0.001 (0.6)	n.d.
Quadruple mutant (W570G/W397F/W275G/Y171G)	0.01 ± 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 3.2 ให้ข้อสรุปว่าการเปลี่ยนกรดอะมิโนวงแหวนยกเว้น W397 มีผลต่อการสลายของสับสเตรทโมเลกุลเล็ก ๆ และไคตินโพลีเมอร์ จากการวิเคราะห์ชนิดของผลิตภัณฑ์น้ำตาลที่ได้จากการสลาย colloidal chitin และไคโตโอลิโกแซคคาร์ไรด์ขนาด 2-6 หน่วย (NAG_2 - NAG_6) พบว่าโปรตีนกลายพันธุ์ W168G, Y171G, W570G ไม่สามารถสลายไคตินได้ที่เวลา 18 ชั่วโมง ส่วนโปรตีน W275G และ W397F สามารถสลาย colloidal chitin ได้ที่เวลาของการบ่มตั้งแต่ 2.5 นาที ถึง 18 ชั่วโมง ได้น้อยลงแต่ไม่เปลี่ยนแปลงรูปแบบการสลายไคตินมากนักเมื่อเทียบกับ wild-type โดยผลิตภัณฑ์หลักที่ได้คือ NAG_2 และผลิตภัณฑ์รองคือ NAG_1 ดังแสดงในรูปที่ 3.4

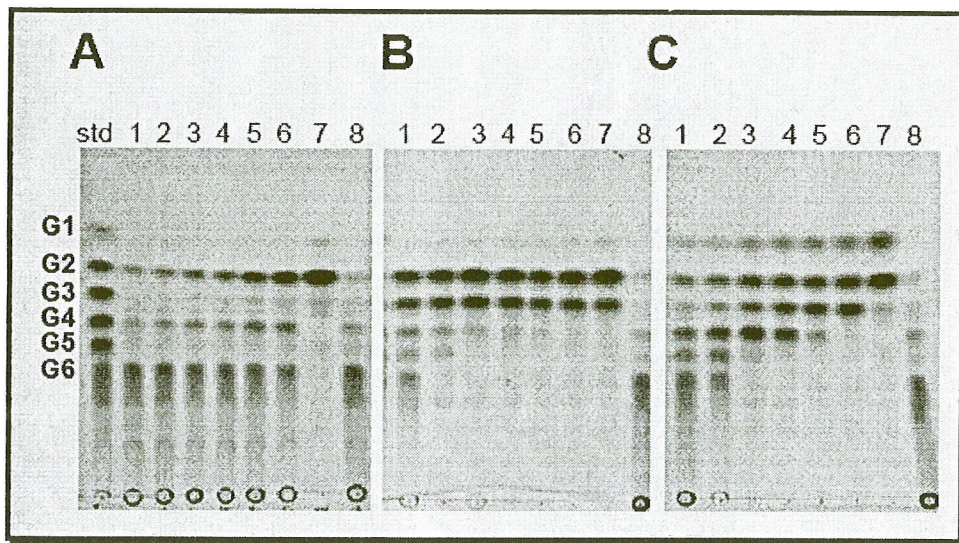


รูปที่ 3.4 การวิเคราะห์ทาง TLC แสดงการสลาย colloidal chitin ด้วย A) wild-type B) W275G และ C) W397F ช่อง std คือ G1-G6 standard mix; 1-7 คือเวลาในการบ่ม 2, 5, 10, 15, 30, 60 นาที และ 18 ชั่วโมง และ 8 คือ substrate blank (แหล่งที่มา Suginta et al., BBA-General Subjects, 2007)

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 ของโปรตีนกลายพันธุ์สองตัวนี้เทียบกับ 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 ชั่วโมงจะได้ผลิตภัณฑ์ที่เป็น $\text{NAG}_2 + \text{NAG}_1$ ซึ่งลักษณะการย่อยน้ำตาล NAG_6 ของโปรตีนกลายพันธุ์ทั้งสองต่างไปจากโปรตีน wild-type อย่างสิ้นเชิง (รูปที่ 3.5) โดยที่ผลิตภัณฑ์หลักของการสลาย NAG_6 ของ wild-type คือน้ำตาล $\text{NAG}_2 + \text{NAG}_4$



สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่.....-6 ต.ค. 2556
เลขทะเบียน.....245769
เลขเรียกหนังสือ.....

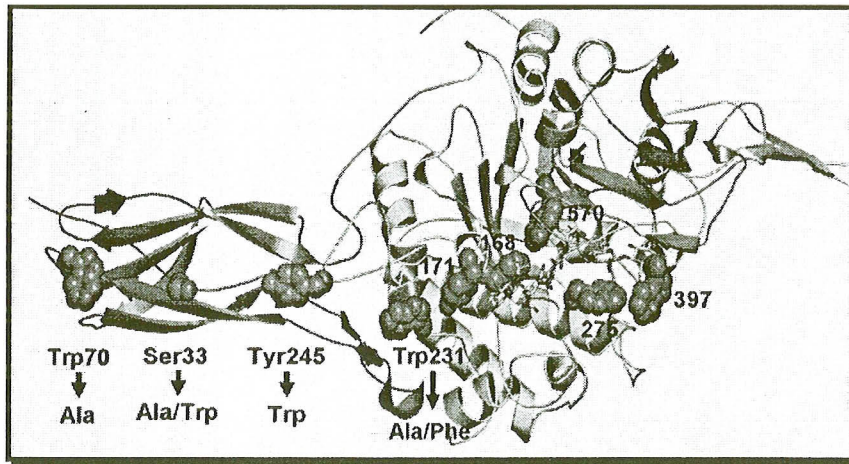


รูปที่ 3.5 การวิเคราะห์ทาง TLC ที่แสดงรูปแบบการสลาย hexaNAg ด้วย A) wild-type B) W275G และ C) W397F ช่องที่ std คือ G1-G6 standard mix; 1-7 เวลาที่ใช้ในการบ่มตั้งแต่ 2, 5, 10, 15, 30, 60 นาที และ 18 ชั่วโมง; 8 คือ substrate blank (แหล่งที่มา Suginta et al., BBA-General Subjects, 2007)

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

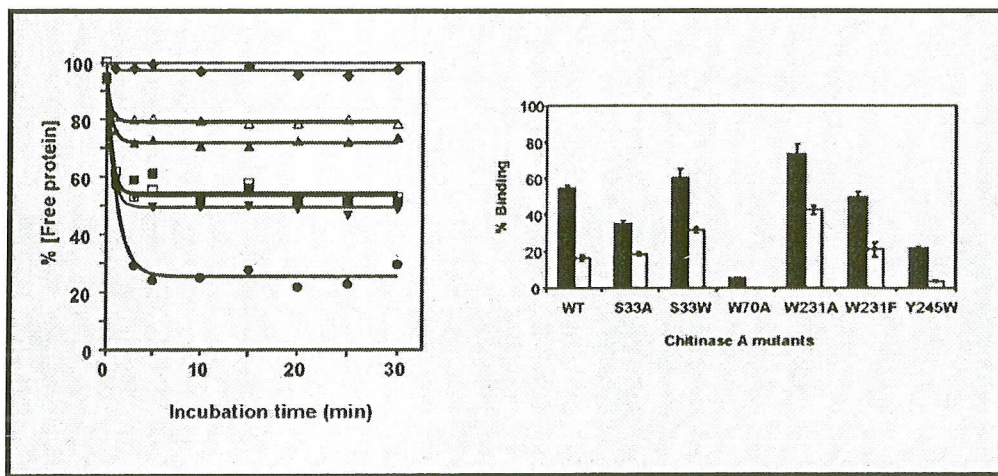
3.2. การศึกษาผลของการกลายพันธุ์ที่บริเวณจับกับไคติน

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 *S. marcescens* เป็นต้นแบบพบว่ากรดอะมิโนทั้งหมดนี้มีลักษณะ conserved และมีการจัดเรียงตัวอยู่ที่ผิว (surface exposed) ของเอนไซม์ โดยที่กรดอะมิโน Trp70 จะอยู่นอกสุดและ Trp231 จะอยู่ด้านในสุดติดกับปลายด้านรีดิวซ์ (รูปที่ 3.6)



รูปที่ 3.6 แบบจำลองโครงสร้างสามมิติของไคติเนส เอ จากแบคทีเรีย *V. 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 3.7A และ 3.7B



รูปที่ 3.7 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)

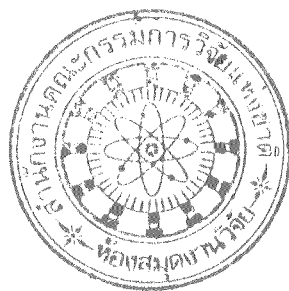
เมื่อศึกษาผลของการกลายพันธุ์ต่อค่า hydrolytic activity ของเอนไซม์ต่อสับสเตรทสามชนิดคือ pNP-[GlcNAc]₂, crystalline chitin และ colloidal chitin ดังแสดงในตารางที่ 3.2 พบว่าการกลายพันธุ์มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่า hydrolytic activity ของ pNP สับสเตรทเพียงเล็กน้อย แต่พบว่าโปรตีนกลายพันธุ์ S33A W70A W231A และ W231F ให้ค่าแอกติวิตี้ต่อสับสเตรทสายยาวคือ colloidal chitin และ crystalline chitin ลดลงอย่างมาก เมื่อเทียบกับโปรตีนดั้งเดิม ส่วนโปรตีนกลายพันธุ์ S33W และ Y245W จะให้ค่าแอกติวิตี้สูงขึ้น

ตารางที่ 3.2 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 3.3

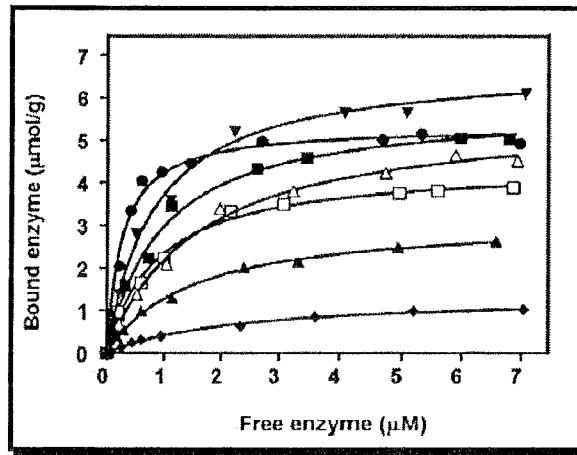


ตารางที่ 3.3 ผลของการกลายพันธุ์ต่อค่าจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ไคติเนส เอ (แหล่งที่มา Pantoom et al., BMC-Biochem, 2008)

Chitinase A variant	Chitohexaose			Colloidal chitin		
	$K_m(\mu\text{M})$	$k_{cat}(\text{s}^{-1})$	$k_{cat}/K_m(\text{s}^{-1}\text{M}^{-1})$	$K_m(10^1 \text{ mg ml}^{-1})$	$k_{cat}(\text{s}^{-1})$	$k_{cat}/K_m(10^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ mg ml}^{-1})$
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.

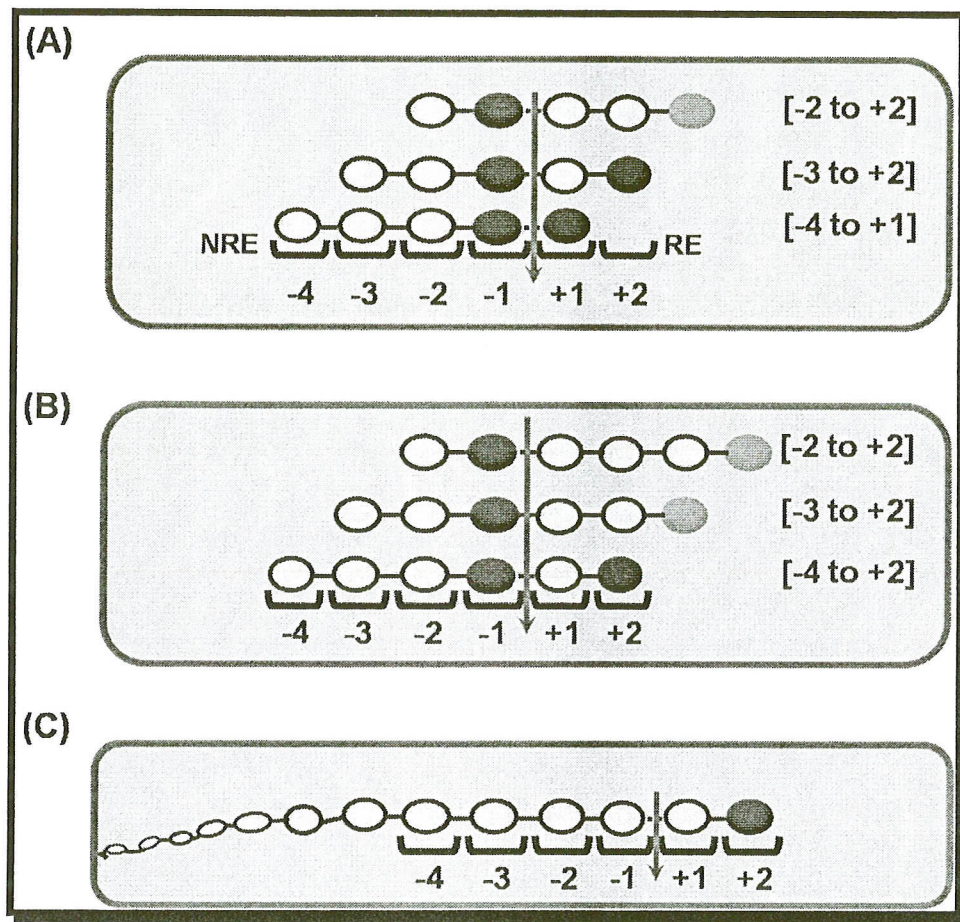
การศึกษาค่า adsorption isotherms พบว่า S33W และ W231A ให้ค่าการจับกับ colloidal chitin สูงกว่าโปรตีน wild-type ส่วน ไคติเนสกลายพันธุ์ W70A, S33A, W231F และ Y245W ให้ค่าการจับกับไคตินน้อยกว่า เมื่อคำนวณหาค่า dissociation binding constants (K_d) จากกราฟในรูปที่ 3.8 ให้ค่า K_d ของ wild-type เป็น $0.95 \pm 0.11 \mu\text{M}$ 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 3.7 และตารางที่ 3.3 ตามลำดับ



รูปที่ 3.8 Adsorption binding isotherms ของโปรตีนกลายพันธุ์ที่ผิวโปรตีนกับ colloidal chitin (closed bar) สัญลักษณ์คือ wild-type (■); S33A (▲); S33W (▼); W70A (◆); W231A (●); W231F (□); และ Y245W (△) (แหล่งที่มา Pantoom et al., BMC-Biochem, 2008)

3.3. การศึกษากลไกการเลือกจับของสับสเตรทบนบริเวณเร่งและการเลือกใช้อะโนเมอร์ของเอนไซม์ไคติเนส

งานวิจัยขั้นต่อมาได้ทำการศึกษาความเลือกจับของสับสเตรทชนิดต่าง ๆ บนบริเวณ substrate binding subsites ของเอนไซม์ โดยใช้เทคนิค quantitative HPLC MS จากข้อเสนองานของ Watanabe และ ผู้ร่วมวิจัย (Imai et al., 2002) ที่ว่าน้ำตาลโคโตโอลิโกแซคคาไรด์สายสั้นจะเข้าจับกับบริเวณจับแบบสุ่ม ส่วนน้ำตาลไคตินสายยาวเข้าสู่บริเวณเร่งโดยการ feed เข้าจากทางด้านโดเมนจับไคติน (ChBD) ด้านเดียวเท่านั้น ในการทดลองนี้จึงได้เสนอกฎการเข้าจับของน้ำตาล pentaNAG และ hexaNAG ซึ่งเป็นตัวแทนของน้ำตาลสายสั้น และไคตินสายยาว ดังแสดงในรูปที่ 3.9



รูปที่ 3.9 กลไกการจับของน้ำตาลโคโตโอลิโกแซคคาไรด์และโคตินที่บริเวณเร่งของเอนไซม์ไคติเนส (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 3.9A) ขณะที่น้ำตาล hexaNAG ก็สามารถจับที่บริเวณจับได้สามแบบเช่นกันคือ คือ 1) จับที่ subsites -4 ถึง +2; 2) จับที่ subsites -3 ถึง +2; และ 3) จับที่ subsites -2 ถึง +2 (รูปที่ 3.9B) ส่วนโคตินสายยาวจะจับได้แบบเดียวคือปลายด้านรีดิวซ์จะเริ่มที่บริเวณ +2 ส่วนปลายด้านออกรีดิวซ์ขยายมาทางด้านบริเวณ -4 และด้านโดเมนจับโคตินดังรูปที่ 3.9C

การศึกษาการย่อยที่เวลาเริ่มต้นที่ 0°C แล้วตรวจหาปริมาณของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นโดยเทคนิค quantitative HPLC ESI/MS พบว่าไคติเนสดั้งเดิมย่อยสลาย pentaNAG จะถูกย่อยเป็นผลิตภัณฑ์สองชนิดคือ NAG_2 และ NAG_3 และย่อย hexaNAG ให้เป็น NAG_2 , NAG_3 และ NAG_4 ซึ่งแสดงว่าการตัดพันธะ

ไกลโคซิดิกเกิดขึ้นสองตำแหน่งคือ ตำแหน่งที่สองจากปลายสายและตำแหน่งกลางสายน้ำตาล ส่วนการประมาณเปอร์เซ็นต์ของปีต้าอะโนเมอร์ของผลิตภัณฑ์น้ำตาลที่ได้ได้แสดงไว้ในตารางที่ 3.4

ตารางที่ 3.4 การประมาณผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการสลายโคโตโอลิโกแซคคาไรด์โดยวิธี quantitative HPLC MS analysis (แหล่งที่มา Suginta et al., J Chem Biol, 2009)

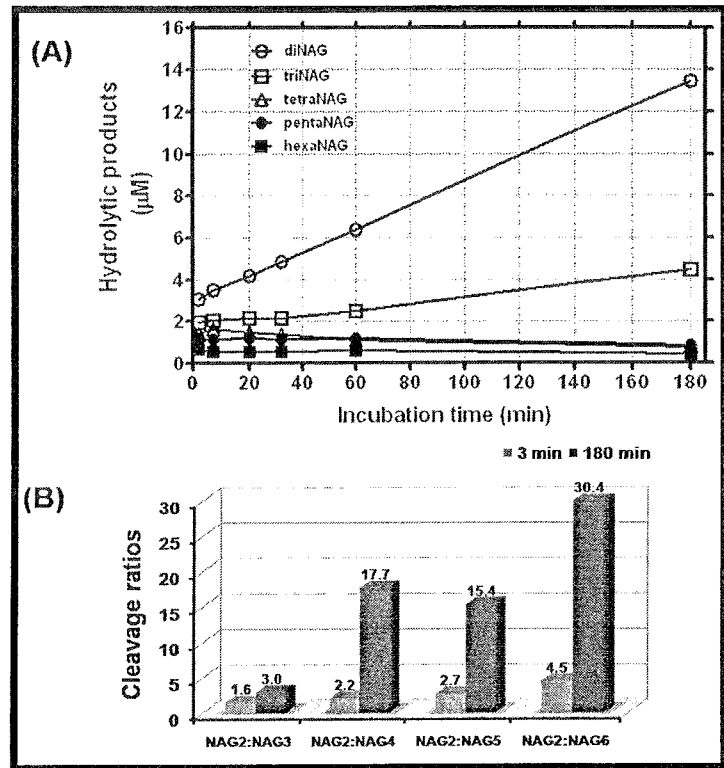
Substrate	Enzyme	The β content of initial products				
		NAG1	NAG2	NAG3	NAG4	NAG5
pentaNAG (NAG5)	Wild-type	-	92 (100) ^a	41(42)	-	-
	W275G	-	92	68	-	-
	W397F	85	69	100	100	-
hexaNAG (NAG6)	Wild-type	-	90(100) ^b	67(71)	45(48)	-
	W275G	-	90	64	82	-
	W397F	40	66	100	100	100

^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 3.4 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 สอดคล้องกับค่าคำนวณของผลิตภัณฑ์ได้จากการจับของสับสเตรทโดยใช้กลไกแบบผสมระหว่าง -3 to +2 binding mode กับ -2 to +2 binding mode คือ 100% β NAG₂, 71% β NAG₃, และ 48% β NAG₄ ตามลำดับ (ตารางที่ 3.4 ค่าในวงเล็บ)

ส่วนผลของการสลายโคตินพบว่าเอนไซม์โคติเนสย่อยโคตินเป็นน้ำตาลโคโตโอลิโกแซคคาไรด์สายสั้น ๆ มีขนาดตั้งแต่ NAG-NAG₆ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่ได้ศึกษามาก่อนแล้วแต่ NAG₂ จัดเป็นผลิตภัณฑ์หลักของการย่อย โดยที่เวลาเริ่มต้นของการย่อย (3 นาที) เอนไซม์ผลิต NAG₂ ได้ประมาณ 3 μ M และที่สิ้นสุดของปฏิกิริยาจะได้ NAG₂ ปริมาณ 13 μ M ส่วนผลิตภัณฑ์รองลงมาคือ NAG₃ ที่ผลิตได้ในช่วงต้นคือ 2 μ M และสิ้นสุดที่ 4 μ M ส่วนผลิตภัณฑ์อื่นจัดเป็น intermediate ที่สร้างในปริมาณน้อย (น้อยกว่า 2 μ M) ผลการทดลองที่ได้ยืนยันว่าเอนไซม์โคติเนสตัดสายโคตินในลักษณะผสมคือสายน้ำตาลสั้น ๆ ตั้งแต่ 3 หน่วยขึ้นไปเกิดจากการจับแบบ random binding และโดยการตัดด้วย endo activity ส่วนน้ำตาล NAG₂ เกือบทั้งหมดถูกสร้างโดยกลไกแบบ feeding โดยการตัดด้วย exo activity (รูปที่ 3.10A) เมื่อดำเนินการ

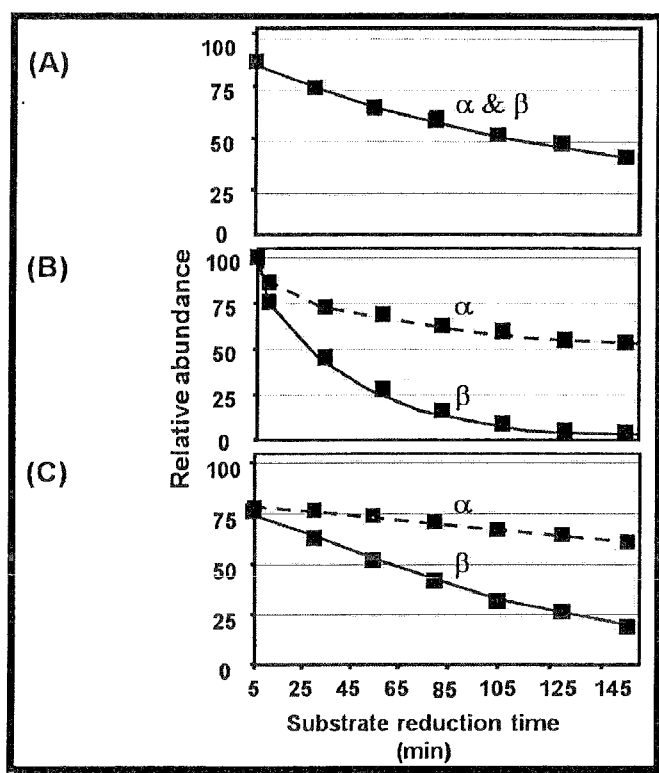
cleavage ratio ของน้ำตาล NAG_2 กับน้ำตาลผลิตภัณฑ์อื่น ๆ เทียบกันระหว่างเวลาย่อยเริ่มต้นที่ 3 นาที กับ เวลาสิ้นสุดในการทำปฏิกิริยาที่ 3 ชั่วโมงพบว่าสัดส่วนนี้ของ NAG_2 ต่อน้ำตาลชนิดต่าง ๆ มีค่าสูงขึ้นทั้งหมด กล่าวคือ $\text{NAG}_2:\text{NAG}_3$ สูงขึ้น 1.9 เท่า $\text{NAG}_2:\text{NAG}_4$ สูงขึ้น 9 เท่า $\text{NAG}_2:\text{NAG}_5$ สูงขึ้น 5 เท่า และ $\text{NAG}_2:\text{NAG}_6$ สูงขึ้น 6 เท่า (รูปที่ 3.10B) ซึ่งอัตราส่วนของ NAG ต่อน้ำตาล ๆ อื่น ๆ ที่สูงขึ้นที่เวลาในการทำ สลายนานขึ้นแสดงว่าการตัดพันธะนั้นจะเกิดขึ้นโดยขบวนการ feeding และแสดงถึงการย่อยสายโคตินแบบ progressive hydrolysis



รูปที่ 3.10 ปริมาณของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาการย่อย chitin โดยวิธี quantitative HPLC MS (A) Time course of chitin hydrolysis (B) Cleavage ratios (แหล่งที่มา Suginta et al., J Chem Biol, 2009)

การทดลองต่อมาคือการศึกษากลไกของการสลายพันธ์ต่อการเลือกใช้อะโนเมอร์ของสับสเตรท ดังแสดงในรูปที่ 3.11A พบว่าในช่วงเวลาในการทำปฏิกิริยาดังแต่ 0-150 นาที พบว่าอัตราการสลาย β -anomer ของสับสเตรทไม่แตกต่างจากอัตราการสลาย α -anomer ทั้งนี้แสดงให้เห็นว่าสับสเตรท น่าจะจับกับบริเวณเร่งของเอนไซม์โดยที่ปลายด้านรีดิวซ์ที่ยื่นออกมานอก substrate binding subsites และอยู่ในสารละลายในโครงรูป β - หรือ α -anomer อยู่ในปริมาณสมดุล (48% β และ 52% α) ผลการทดลองสอดคล้องกับการจับของสับสเตรท hexaNAG แบบ -3 to +2 และ +2 to +2 binding modes (รูปที่ 3.9B) เมื่อทำการเปลี่ยนกรดอะมิโนที่ปลายด้านรีดิวซ์สองตัวคือ Trp275 เป็น Gly และ Trp397 เป็น Phe พบว่า

โปรตีนกลายพันธุ์ทั้งสองคือ W275G และ W397F มีความสามารถในการใช้อะโนเมอร์ของสับสเตรทเปลี่ยนไปกล่าวคือให้อัตราการสลาย β -anomer ได้ดีกว่า α -anomer มากเมื่อเทียบกับอัตราการสลายของโปรตีนดั้งเดิม (รูปที่ 3.11B,C) กรดอะมิโน Trp275 มีความสำคัญกับการจับกับน้ำตาล GlcNAc ที่ตำแหน่งย่อย (cleavage site, -1 to +1) ส่วนกรดอะมิโน Trp397 มีความสำคัญต่อการเลือกจับของเอนไซม์กับน้ำตาลด้านปลายรีดิวซ์คือ +2NAG จากการศึกษาโครงสร้างของเอนไซม์ไคติเนส เอ กลายพันธุ์กับน้ำตาล pentaNAG และ hexaNAG (Songsiriritthigul et al., 2008) พบว่าการจับกับน้ำตาลที่บริเวณเร่งเกิดขึ้นด้วยพันธะไฮโดรเจนและแรงแไฮโดรโฟบิกเป็นหลัก การเปลี่ยนชนิดของกรดอะมิโน Trp275 เป็นกรดอะมิโน Gly ทำให้มีผลกระทบต่อน้ำตาลที่กระทำต่อน้ำตาลที่ตำแหน่ง -1 และ +1 ส่งผลให้มีการเปลี่ยนการเลือกจับของเอนไซม์โดยมีการเลื่อนตำแหน่งของสายสับสเตรทไปทางด้านนอนรีดิวซ์ได้เล็กน้อย จากตารางที่ 3.4 จะเห็นว่าการสลายน้ำตาล hexaNAG จะให้ผลิตภัณฑ์เป็น NAG_2 , NAG_3 และ NAG_4 เหมือนเดิมแต่เปอร์เซ็นต์ของ β content ที่ได้เปลี่ยนไปจากเดิมแสดงว่าสายน้ำตาลมีการเข้าจับที่บริเวณเร่งเปลี่ยนไป นอกจากนี้โปรตีนกลายพันธุ์ W275G ยังให้ค่าความจำเพาะต่อสับสเตรท (substrate specificity) ทั้งสามตัวคือ pentaNAG hexaNAG และ colloidal chitin ลดลงประมาณ 5 เท่า โดยมีการเปลี่ยนค่าความชอบในการจับ (affinity of binding, K_m) ต่อสับสเตรท เล็กน้อย แต่ค่าคงที่ในการสลาย (catalytic rate, k_{cat}) ลดลงอย่างมากเมื่อเทียบกับค่าที่ได้จากโปรตีนดั้งเดิม (ตารางที่ 3.5)



รูปที่ 3.11 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 ผลรวมของการกลายพันธุ์ก็คือทำให้สายน้ำตาลโคโตโอลิโกแซคคาร์ไรด์ขยับมาทางด้านปลายนอนรีดิวซ์ได้และอาจจับกับตำแหน่งจับแบบยืดหยุ่นมากขึ้นทำให้โอกาสที่พันธะไกลโคซิดิกของน้ำตาลที่ตำแหน่งต่างๆ จะพบกับตำแหน่งย่อยได้มากขึ้นผลคือทำให้ผลิตผลในการย่อยหลากหลายสปีชีส์ตั้งแต่ NAG-NAG₅ ดังแสดงในตารางที่ 3.4 และทำให้ค่าคงที่ทางจลนพลศาสตร์เปลี่ยนไปด้วยโดยไปเพิ่มค่า k_{cat} ของการสลายน้ำตาล pentaNAG และ hexaNAG เป็น 8 และ 60 เท่าตามลำดับ (ตารางที่ 3.5)

ตารางที่ 3.5 ค่าจลนพลศาสตร์ของการสลายสับสเตรทโคโตโอลิโกแซคคาร์ไรด์และโคตินของเอนไซม์โคตินเนสเต็มและเอนไซม์โคตินเนสกลายพันธุ์ (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 ($s^{-1}M^{-1}$)	K_m (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($s^{-1}M^{-1}$)	K_m ($mg\ ml^{-1}$)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($s^{-1}mg\ ml^{-1}$)
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 3.11 จะเห็นว่าการกลายพันธุ์ของกรดอะมิโน Trp275 และ Trp397 ให้ผลต่อค่าจลนพลศาสตร์ของการสลายโคตินต่างจากค่าจลนพลศาสตร์ของการสลายโคโตโอลิโกแซคคาร์ไรด์ เนื่องจากกลไกการจับของสับสเตรททั้งสองไม่เหมือนกัน ส่วนของโคตินจะเข้าจับโดยปลายด้านรีดิวซ์จะเคลื่อนเข้าทางด้านปลายของโดเมนจับโคตินโดยการจับระหว่างสายของโคตินโพลีเมอร์กับ 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 ข้อสันนิษฐานนี้สอดคล้องกับผลการจลนพลศาสตร์ของการสลายโคตินด้วยโปรตีนกลายพันธุ์ W275G และ W397F ให้ค่า K_m เพิ่ม ส่วนค่า k_{cat} ลดลงอย่างมาก