228061

บทคัดย่อ

เอนไซม์ไคติเนส เอ จากเชื้อแบคทีเรียในทะเล *Vibrio harveyi* เป็นเอนไซม์ที่สลายไคตินให้เป็นน้ำตาลไคโตโอลิโกแซคคาร์ไรด์และไคโตไบโอสเป็นผลิตผลหลัก งานวิจัยก่อนหน้าได้ทำการโคลนยีนไคติเนส เอ และได้ศึกษาคุณสมบัติทางเอนไซม์ไคติเนส เอ งานวิจัยนี้อธิบายบทบาทของกรดอะมิโนวงแหวนที่บริเวณจับกับสับสเตรทและกรดอะมิโนที่ผิวของเอนไซม์ในการสลายสับสเตรทไคตินและไคโตโอลิโกแซคคาร์ไรด์โดยทำการเปลี่ยนกรดอะมิโน Trp70 Trp168 Tyr171 Trp231 Tyr245 Trp275 Trp397 และ Trp570 การทดสอบหาค่า specific hydrolyzing activity ของไคติเนสกลายพันธุ์ พบว่ามีเอนไซม์กลายพันธุ์ตัวเดียวคือ W397F ที่ให้ค่าแอคติวิตี้สูงกว่าเอนไซม์ดั้งเดิมส่วนเอนไซม์กลายพันธุ์อื่นมีค่าแอคติวิตี้ลดลงอย่างมาก การวิเคราะห์หาน้ำตาลผลิตผลที่สร้างขึ้นโดยวิธี TLC พบว่าเมื่อกรดอะมิโนที่ตำแหน่งรีดิวซ์ Trp275 ถูกเปลี่ยนเป็น Gly และ Trp397 เปลี่ยนเป็น Phe ทำให้รูปแบบการสลายน้ำตาลสายสั้นเปลี่ยนไปอย่างสิ้นเชิงแสดงว่ากรดอะมิโนทั้งสองน่าจะมีความสำคัญต่อการเลือกจับของน้ำตาลไคโตโอลิโกแซคคาร์ไรด์ การศึกษาการจับกับไคตินและการทดลองทางจลนพลศาสตร์แสดงให้เห็นว่า Trp70 ซึ่งพบอยู่ที่ผิวที่ปลายด้านเอ็นของโดเมนจับไคตินมีความสำคัญมากต่อการจับกับไคตินสายยาว การตรวจหารูปแบบการจับของสับสเตรทโดยเทคนิค HPLC MS พบว่า NAG_6 ชอบบริเวณจับ -2 ถึง + 2 มากกว่าบริเวณจับ -3 ถึง +2 ส่วน NAG_5 จะจับกับบริเวณจับ -2 ถึง +2 อย่างเดียวในขณะที่ crystalline α chitin จะเริ่มจับที่บริเวณจับได้หลายตำแหน่งทำให้สลายตัวกลางไคโตโอลิโกแซคคาร์ไรด์ได้หลายชนิดซึ่งตัวกลางเหล่านี้จะจับกับตำแหน่ง -2 ถึง +2 เป็นหลัก นอกจากนี้ยังพบว่าไคติเนสกลายพันธุ์ W275G และ W397F มีความชอบต่อสับสเตรทชนิด β มากกว่าสับสเตรทชนิด α การศึกษาโครงสร้างผลึกของเอนไซม์ไคติเนสดั้งเดิมและเอนไซม์กลายพันธุ์ที่ไม่เร่งปฏิกิริยา E315M ในสภาวะที่ไม่มีและมีสับสเตรทให้ความละเอียดของโครงสร้างสูงในช่วง 2.0 – 1.7 อังสตรอม โครงสร้างโดยรวมของเอนไซม์ไคติเนสประกอบด้วย 3 โดเมนแยกกันคือ i) โดเมนจับไคตินที่ปลายด้านเอ็น ii) โดเมนเร่งปฏิกิริยา $(\alpha/\beta)_8$ TIM-barrel และ iii) โดเมนแทรกขนาดเล็ก (α+β) บริเวณเร่งของเอนไซม์มีลักษณะเป็นร่องยาวลึกประกอบด้วยบริเวณจับหกบริเวณคือ (-4)(-3)(-2)(-1)(+1)(+2) โครงสร้างเชิงซ้อนของ E315M กับไคโตโอลิโกแซคคาร์ไรด์แสดงโครงรูปตรงของน้ำตาล NAG_5 แต่โครงรูปงอของน้ำตาล NAG_6 ข้อมูลโครงสร้างที่ได้ให้หลักฐานว่าน้ำตาลที่จับอยู่มีการเปลี่ยนโครงรูปก่อนถูกสลายซึ่งน่าจะเกิดผ่าน 'slide-and- bend' mechanism

228061

ABSTRACT

Chitinase A from a marine bacterium *Vibrio harveyi* is an enzyme that degrades chitin to chitooligosaccharides, yielding chitobioase as the major product. The gene encodes chitinase A was previously cloned and its enzymatic properties characterized. This study describes the functional roles of the aromatic residues located at the substrate binding cleft and the surface-exposed residues in chitin and chitooligosaccharide hydrolyses. Point mutations of Trp70, Trp168, Tyr171, Trp231, Tyr245, Trp275, Trp397, and Trp570, were generated. Investigation of specific hydrolyzing activity indicated that only mutant W397F had enhanced activity, while other mutants showed a significant loss of the activity. TLC analysis of product formation showed a complete change in the hydrolytic patterns of short-chain substrates when the reducing end residues Trp275 was mutated Gly and Trp397 to Phe, suggesting that both residues were crucial for the binding selectivity of chitinoligosaccharides. Chitin binding assay and kinetic experiments suggested that Trp70, which is located on the surface at the *N*-terminal end of the chitin binding domain, was the essential binding residue for a long-chain chitin. Assessment of substrate binding modes by HPLC MS revealed that NAG_6 preferred subsites -2 to + 2 over subsites -3 to +2 and NAG_5 only bound to subsites -2 to +2. Crystalline α chitin initially occupied various subsites, generating variuos chitioligosaccharide 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 e and presenc of substrates to high resolutions of 2.0 – 1.7 Å. The overall structure of chitinase A comprises three distinct domains: i) the N-terminal chitin-binding domain; ii) the main catalytic $(\alpha/\beta)_8$ 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 NAG_5, but a bent conformation of NAG_6. The crystallographic data provides evidence that the interacting sugars undergo conformational changes prior to hydrolysis most likely via the 'slide-and-bend' mechanism.