

ชมภูษ สวัสดิฤทธิกุล : การศึกษาโครงสร้างและหน้าที่ของเอนไซม์ไคตินเอส เอ จากเชื้อ
แบคทีเรีย *Vibrio carchariae* (STRUCTURAL AND FUNCTIONAL
CHARACTERIZATION OF CHITINASE A FROM *Vibrio carchariae*)
อาจารย์ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิภา สุจินต์, 236 หน้า.

ไคตินเอส เอ จากเชื้อ *Vibrio carchariae* เป็นเอนโดไคตินเอสทำหน้าที่สลายไคตินให้ได้
ผลิตภัณฑ์คือ GlcNAc_2 เพื่อนำไปสู่ความเข้าใจกลไกการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ให้ดีขึ้น จึงได้
ทำการตกผลึกเอนไซม์สี่ชนิด ได้แก่ ผลึกโปรตีนดั้งเดิม ผลึกโปรตีนกลายพันธุ์ E315M ผลึก
เชิงซ้อนของโปรตีนกลายพันธุ์ E315M กับสารตั้งต้น NAG_5 และ NAG_6 และทำการวัดการหักเห
ของแสงเอกซเรย์ได้ความละเอียดถึง 2.00 Å 1.70 Å 1.72 Å และ 1.80 Å พบว่าโครงสร้างสามมิติ
ของเอนไซม์ไคตินเอส เอ มีสามองค์ประกอบหลักได้แก่ หน่วยจับสารตั้งต้นที่ปลาย N หน่วยย่อย
สลายสารตั้งต้นมีโครงสร้างเป็น $(\beta/\alpha)_8$ -TIM-barrel และหน่วยแทรกระหว่างหน่วยย่อยสลายมี
โครงสร้างเป็น $\alpha+\beta$ หน่วยย่อยสลายมีลักษณะเป็นร่องยาวลักษณะ 33 Å × 14 Å มีปลายเปิด
ทั้งสองด้าน และมีบริเวณจับกับสารตั้งต้นประกอบด้วยหกบริเวณย่อย ตั้งแต่ -4 (ด้านนอนรีดิวซิง)
จนถึง +2 (ด้านรีดิวซิง) โครงสร้างของ E315M- NAG_5 แสดงให้เห็นว่าน้ำตาล NAG_5 จับกับบริเวณ
จับด้วยโครงรูปแบบตรง ขณะที่โครงสร้างของ E315M- NAG_6 แสดงให้เห็นว่าน้ำตาล NAG_6 จับกับ
บริเวณจับด้วยโครงรูปแบบหัก การตรวจพบโครงรูปชั่วคราวจากแผนที่ความหนาแน่นอิเล็กตรอน
ของโครงสร้าง E315M- NAG_6 แสดงให้เห็นว่าน้ำตาลที่จับกับบริเวณเร่งมีการเปลี่ยนโครงรูปเพื่อทำ
ให้เกิดปฏิกิริยาการสลาย นอกจากนี้ยังพบว่ากรดอะมิโนวงแหวนหลายตัวที่ไม่เปลี่ยนแปลงจัดเรียง
เป็นแนวอยู่ที่บริเวณจับและทำหน้าที่จับกับน้ำตาลโดยการสร้างพันธะไฮโดรเจนกับวงแหวนไพรา
โนสของน้ำตาล

การกลายพันธุ์เฉพาะตำแหน่งของกรดอะมิโน Trp168 Tyr171 Trp275 และ Trp570 ให้เป็น
ไกลซีน และ Trp397 ให้เป็นฟีนอลอะลานีน ส่งผลให้มีการเปลี่ยนแปลงรูปแบบการย่อยสลายของไค
โตโอลิโกแซคคาไรด์ ซึ่งบ่งชี้ว่ากรดอะมิโนเหล่านี้มีความสำคัญต่อการสลายของไคตินที่ละลายน้ำ
ได้

สาขาวิชาชีวเคมี
ปีการศึกษา 2550

ลายมือชื่อนักศึกษา _____
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา _____
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม _____

CHOMPHUNUCH SONGSIRIRITTHIGUL : STRUCTURAL AND
FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF CHITINASE A FROM *Vibrio*
carchariae. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. WIPA SUGINTA, Ph.D.
236 PP.

CHITINASE A/CHITOLIGOSACCHARIDES/ENDOCHITINASE/TIM BARREL
DOMAIN/TRANSIENT CONFORMATION/*Vibrio carchariae*

Chitinase A from *Vibrio carchariae* is an endochitinase that degrades chitin, yielding GlcNAc₂ as the end product. To understand the mode of enzyme action, four crystal structures of wild-type chitinase A, mutant E315M without substrate and mutant E315M in complex with NAG₅ and NAG₆ were refined at 2.00 Å, 1.70 Å, 1.72 Å and 1.80 Å resolution. The overall structure of chitinase A comprises three separate domains; an *N*-terminal chitin-binding domain, a catalytic (β/α)₈-TIM-barrel domain, and a small (α+β) insertion domain. The substrate binding cleft of the enzyme has a long, deep groove structure of 33 Å × 14 Å and comprises multiple binding sites extended from subsite -4 (at the non-reducing end) to subsite +2 (at the reducing end). The crystal structures of E315M-NAG₅ and E315M-NAG₆ revealed that the enzyme bound to the straight conformation of NAG₅, but to the bent conformation of NAG₆. The transient conformation of -1 NAG observed in the electron density map of E315M-NAG₆ complex strongly suggested that the interacting sugars adopted a conformational change to facilitate hydrolysis. Several conserved aromatic residues that lie along the substrate binding cleft are found to act as the binding residues, by forming hydrophobic stack against the pyranose rings of the bound sugars.