ชมภูนุช ส่งสิริฤทธิกุล : การศึกษาโครงสร้างและหน้าที่ของเอนไซม์ไคติเนส เอ จากเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio carchariae* (STRUCTURAL AND FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF CHITINASE A FROM *Vibrio carchariae*) อาจารย์ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิภา สุจินต์, 236 หน้า.

ไคติเนส เอ จากเชื้อ *Vibrio carchariae* เป็นเอ็นโดไคติเนสทำหน้าที่สลายไคตินให้ได้ผลิตผลสุดท้ายคือ $GlcNAc_2$ เพื่อนำไปสู่ความเข้าใจกลไกการเร่งปฏิกริยาของเอนไซม์ให้ดีขึ้น จึงได้ทำการตกผลึกเอนไซม์สี่ชนิด ได้แก่ ผลึกโปรตีนดั้งเดิม ผลึกโปรตีนกลายพันธุ์ E315M ผลึกเชิงซ้อนของโปรตีนกลายพันธุ์ E315M กับสารตั้งต้น NAG_5 และ NAG_6 และทำการวัดการหักเหของแสงเอกซเรย์ได้ความละเอียดถึง 2.00 Å 1.70 Å 1.72 Å และ 1.80 Å พบว่าโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ไคติเนส เอ มีสามองค์ประกอบหลักได้แก่ หน่วยจับสารตั้งต้นที่ปลาย N หน่วยย่อยสลายสารตั้งต้นมีโครงสร้างเป็น $(\beta/\alpha)_8$-TIM-barrel และหน่วยแทรกระหว่างหน่วยย่อยสลายมีโครงสร้างเป็น $\alpha+\beta$ หน่วยย่อยสลายมีลักษณะเป็นร่องยาวลึกขนาด 33 Å × 14 Å มีปลายเปิดทั้งสองด้าน และมีบริเวณจับกับสารตั้งต้นประกอบด้วยหกบริเวณย่อย ตั้งแต่ -4 (ด้านนอนรีดิวซิง) จนถึง +2 (ด้านรีดิวซิง) โครงสร้างของ E315M-NAG_5 แสดงให้เห็นว่าน้ำตาล NAG_5 จับกับบริเวณจับด้วยโครงรูปแบบตรง ขณะที่โครงสร้างของ E315M-NAG_6 แสดงให้เห็นว่าน้ำตาล NAG_6 จับกับบริเวณจับด้วยโครงรูปแบบหัก การตรวจพบโครงรูปชั่วคราวจากแผนที่ความหนาแน่นอิเล็กตรอนของโครงสร้าง E315M-NAG_6 แสดงให้เห็นว่าน้ำตาลที่จับกับบริเวณเร่งมีการเปลี่ยนโครงรูปเพื่อทำให้เกิดปฏิกริยาการสลาย นอกจากนี้ยังพบว่ากรดอะมิโนวงแหวนหลายตัวที่ไม่เปลี่ยนแปลงจัดเรียงเป็นแนวอยู่ที่บริเวณจับและทำหน้าที่จับกับน้ำตาลโดยการสร้างชั้นไฮโดรโฟบิกกับวงแหวนไพราโนสของน้ำตาล

การกลายพันธุ์เฉพาะตำแหน่งของกรดอะมิโน Trp168 Tyr171 Trp275 และ Trp570 ให้เป็นไกลซีน และ Trp397 ให้เป็นฟีนิลอะลานีน ส่งผลให้มีการเปลี่ยนแปลงรูปแบบการย่อยสลายของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ ซึ่งบ่งชี้ว่ากรดอะมิโนเหล่านี้มีความสำคัญต่อการสลายของไคตินที่ละลายน้ำได้

สาขาวิชาชีวเคมี ลายมือชื่อนักศึกษา_____

ปีการศึกษา 2550 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/CHITOOLIGOSACCHARIDES/ENDOCHITINASE/TIM BARREL DOMAIN/TRANSIENT CONFORMATION/*Vibrio carchariae*

Chitinase A from *Vibrio carchariae* is an endochitinase that degrades chitin, yielding $GlcNAc_2$ 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 NAG_5 and NAG_6 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 $(\beta/\alpha)_8$-TIM-barrel domain, and a small ($\alpha+\beta$) 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-NAG_5 and E315M-NAG_6 revealed that the enzyme bound to the straight conformation of NAG_5, but to the bent conformation of NAG_6. The transient conformation of -1 NAG observed in the electron density map of E315M-NAG_6 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.

Point mutations of Trp168, Tyr171, Trp275 and Trp570 to glycine and Trp397 to phenylalanine significantly changed the cleavage patterns against chitooligosaccharides, indicating that these residues are important for the hydrolysis of soluble chitin.

School of Biochemistry

Academic Year 2007

Student's Signature_____

Advisor's Signature_____

Co-adviser's Signature_____