นายวัชรินทร์ ชุมจันทร์ : พอรินที่จำเพาะต่อน้ำตาลไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (*Vh*ChiP) จากแบคทีเรียในทะเล *Vibrio harveyi:* การโคลน การแสดงออกและลักษณะเฉพาะเชิงหน้าที่ (CHITOOLIGOSACCHARIDE-SPECIFIC PORIN (*Vh*ChiP) FROM THE MARINE BACTERIUM *VIBRIO HARVEYI* : CLONING, EXPRESSION AND FUNCTIONAL CHARACTERIZATION) อาจารย์ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร. วิภา สุจินต์, 224 หน้า.

การศึกษานี้รายงานถึงการแยกยีนส์ที่สังเคราะห์ไคโตพอรินที่มีชื่อว่า *Vh*ChiP จากจีโนมของแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* โปรตีนไคโตพอรินที่มีในระบบของแบคทีเรียอีโคไล พบว่าเมื่อทำการแสดงออกของโปรตีนดังกล่าวสามารถทนต่อ SDS ว่องไวต่ออุณหภูมิ และมีความจำเพาะต่อแอนติบอดีชนิด anti-ChiP polyclonal antibody จากการตรวจหาคุณสมบัติการสร้างพอริน *Vh*ChiP ด้วยเทคนิค Planar Lipid Membrane (BLM) Reconstitution Technique แบบไม่มีตัวทำละลายโปรตีน *Vh*ChiP สามารถแทรกตัวเข้าไปเพื่อฝังตัวอยู่ในผนังสองชั้นของลิปิดและมีการเปิดแบบสามหน่วยที่เสถียรด้วยค่าการนำผ่านของไอออน (Conductance, G (nS)) เท่ากับ 1.9 ± 0.07 ในสารละลายบัปเฟอร์ที่มี 1 โมลาร์ โพแทสเซียมคลอไรด์ การติดตามผลการวัดค่ากระแสในระดับ microsecond ของโปรตีนหนึ่งโมเลกุลทำให้ทราบว่ามีการแพร่ผ่านของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ ด้วยค่าคงที่การจับเท่ากับ 500,000 M^{-1} ซึ่งแสดงถึงการจับที่ดีที่สุดกับสับสเตรทชนิดไคโตเฮกซะโอส โดยที่ค่า On-rate ขึ้นตรงกับค่าต่างศักย์ไฟฟ้าที่ให้กับระบบ ในขณะเดียวกันก็ยังขึ้นอยู่กับด้านของการเติมน้ำตาล ผลดังกล่าวทำให้ทราบแน่ชัดว่าลักษณะของช่องที่อยู่ภายในโปรตีนมีลักษณะเป็นแบบไม่สมมาตร การทดลอง Liposome swelling assays แสดงให้เห็นถึงการแพร่ผ่านของน้ำตาลไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ และยืนยันว่าไคโตพอรินเป็นช่องแพร่ผ่านที่จำเพาะต่อน้ำตาลไคโตโอลิโกแซคคาไรด์เท่านั้น

จากการศึกษาต่อไปยังแสดงให้เห็นถึงผลที่เกิดขึ้นตรงตำแหน่งภายในช่องแคบของไคโตพอรินที่ใช้สำหรับการแพร่ผ่านของไอออนและน้ำตาลไคโตเฮกซะโอส จากการเปลี่ยนตำแหน่งของ Trp136 ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่อยู่ตรงกลางของช่องพอรินเป็น Ala หรือ Asp ส่งผลให้เกิดการแพร่ผ่านของไอออนผ่านช่องพอรินเพิ่มสูงเล็กน้อย จากการวิเคราะห์กระแสของไอออนที่ถูกปิดกั้นด้วยโมเลกุลของน้ำตาลไคโตเฮกซะโอส ทำให้ทราบแน่ชัดว่าช่องพอรินมีลักษณะไม่สมมาตรต่อการแพร่ผ่านของน้ำตาลจากตำแหน่งของการเติมน้ำตาลและชนิดของความต่างศักย์ไฟฟ้าที่กระตุ้นเข้าไปในระบบ เมื่อเติมน้ำตาลไคโตเฮกซะโอส ที่ด้าน *Cis* พบว่าโปรตีนที่มีการเปลี่ยนแปลงของ

กรดอะมิโนตรงตำแหน่งของ Trp136 เป็น Ala และ Arg ค่า On-rate และ Off-rate ทำให้ทราบว่าเมื่อเปลี่ยนตำแหน่งของ Trp136 มีผลต่อการนำเข้าของน้ำตาลและความชอบในการจับเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัดของช่องพอริน ยิ่งไปกว่านั้นการศึกษาด้วยการไทเทรตน้ำตาลและวัดด้วยวิธี Fluorescence spectroscopy แสดงให้เห็นว่าการแทนที่ Trp136 ส่งผลให้มีการลดลงของค่าคงที่ในการจับกับต่อน้ำตาล ซึ่งผลกระทบมากที่สุดคือการแทนที่ด้วยหมู่ Ala (W136A) เนื่องจากโปรตีนดังกล่าวไม่สามารถจับกับน้ำตาลชนิดไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ สายสั้นๆได้ เช่น $GlcNAc_3$, $GlcNAc_4$ และ $GlcNAc_5$ ตามลำดับ จากการทดลองด้วยวิธี Liposome swelling assays แสดงให้เห็นถึงการลดลงของอัตราการแพร่ผ่านของน้ำตาลไคโตเฮกซะโอส กับชนิดของโปรตีนที่มีการเปลี่ยนตำแหน่งกรดอะมิโนของ W136 ทุกชนิดอีกด้วย *Vh*ChiP ยังแสดงคุณสมบัติเลือกไอออนชนิดประจุบวก (Cation selectivity) ด้วยอัตราส่วนของ P_{K+}/P_{Cl-} เท่ากับ 3.2 (-23 mV) ในสารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์ ในทางตรงกันข้าม โปรตีนกลายพันธุ์ W136D มีการเปลี่ยนแปลงของการเลือกต่อไอออนและสามารถจับกับไอออนชนิดที่เป็นบวกเพิ่มมากขึ้นด้วยอัตราส่วนของ P_{K+}/P_{Cl-} เท่ากับ 4.2 (-28 mV) ในทางตรงกันข้าม โปรตีนกลายพันธุ์ W136R มีการลดลงของการเลือกต่อไอออนชนิดที่มีประจุเป็นบวกด้วยอัตราของ P_{K+}/P_{Cl} เท่ากับ 2.74 (-20 mV) ดังนั้น จากผลการทดลองทำให้ทราบว่า Trp136 มีบทบาทสำคัญต่อการแพร่ผ่านของน้ำตาลผ่านช่องพอรินชนิด *Vh*ChiP

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สาขาวิชาชีวเคมี
ปีการศึกษา 2557

ลายมือชื่อนักศึกษา_____
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา_____
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม_____
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม_____

WATCHARIN CHUMJAN : CHITOOLIGOSACCHARIDE-SPECIFIC PORIN (*Vh*ChiP) FROM THE MARINE BACTERIUM *VIBRIO HARVEYI*: CLONING, EXPRESSION AND FUNCTIONAL CHARACTERIZATION
THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. WIPA SUGINTA, Ph.D. 224 PP.

BLACK LIPID MEMBRANE/*VIBRIO HARVEYI*/*VH*CHIP/PORIN

This study reports isolation of the gene enconding chitoporin, namely *Vh*ChiP, from the genome of *Vibrio harveyi*. The *E. coli* expressed *Vh*ChiP was found to be SDS-resistant, heat-sensitive, and selectively reacting only with anti-ChiP polyclonal antibodies. The pore-forming property of *Vh*ChiP was investigated using solvent-free planar lipid membrane reconstitution technique. *Vh*ChiP inserted into artificial membranes and formed a stable trimeric channel with average single conductance of 1.9 ± 0.07 nS in 1 M KCl. Single channel recordings in the presence of chitosugars with different chain lengths resolved translocation of chitooligosaccharides at microsecond time resolution. The greatest rate was observed for chitohexaose, with the binding constant of K = 500,000 M^{-1}. The on-rates of chitosugars depend on applied voltages, as well as the side of the sugar addition, clearly indicating the inherent asymmetry of the *Vh*ChiP lumen. Liposome swelling assays showed only permeation of chitooligosaccharides, indicating that *Vh*ChiP is a chitooligosaccharide-specific channel.

Further studies reported the effect of the constriction zone on ions transport and chitohexaose translocation. Mutation of Trp136, the amino acid residue locating in the middle of the pore, to Ala or Asp slightly enhanced ion conductivity of the *Vh*ChiP channel. Noise analysis of the ion current in presence of chitohexaose

confirmed that the *Vh*ChiP channel asymmetrically responded to side of sugar addition, as well as applied electrical field. Addition of chitohexaose on the *cis* side of mutants W136A and W136R resulted in great increases in both on-rate and off-rate, suggesting that this mutation of Trp136 particularly interfered sugar accessibility, as well as binding affinity of the channel. In addition, titration measurements using fluorescence spectroscopy showed that the Trp136 substitution caused decreased in the binding constant. The highest effect was observed for the alanine mutant, for which the W136A could not bind to short chain chiooligosaccharides, including $GlcNAc_3$, $GlcNAc_4$ and $GlcNAc_5$, respectively. Liposome swelling assay also showed reduced permeability rate of chitohexaose with all the W136 mutants. *Vh*ChiP showed selectivity toward cation with the P_{K+}/P_{Cl-} ratio of about 3.2 (-23 mV) in a bulk solution of KCl. In contrast, with the mutant W136D, the ion selectivity was changed and attracted more cation (K^+) with the P_{K+}/P_{Cl-} ratio of about 4.2 (-28 mV). On the other hand, the W136R mutant decreased selectivity towards cation with the P_{K+}/P_{Cl-} ratio of about 2.74 (-20 mV). Such result suggested that Trp136 played an important role for sugar translocation through the *Vh*ChiP channel.

School of Biochemistry

Academic Year 2014

Student's Signature_____

Advisor's Signature_____

Co-advisor's Signature_____

Co-adviser's Signature_____