

國立交通大學

應用化學研究所

碩士論文

仙人掌桿菌幾丁質酵素的過量表現
與催化反應機制的探討

Overexpression and mechanistic study of
Bacillus cereus NCTU2 chitinase



研究生：蔡蕙如

指導教授：李耀坤 博士

中華民國九十三年七月

仙人掌桿菌幾丁質酵素的過量表現與催化反應機制的探討

學生：蔡蕙如

指導教授：李耀坤 博士

國立交通大學應用化學研究所碩士班

摘要

從 *Bacillus cereus* NCTU2 選殖出來的含訊息胜肽幾丁質酵素基因建構於載體 pET-22b(+) 上，成功於大腸桿菌 BL21 (DE3) 中大量表現，胞內酵素經疏水性管柱層析，得到 90% 以上均質度之幾丁質酵素，命名為 ChiNCTU2，以電灑式質譜儀分析其分子量為 36236 Da，此與成熟蛋白之分子量吻合，顯示此訊息胜肽可被大腸桿菌辨識而遭切除。

重組酵素穩定性高，反應最佳活性在 pH 約 5.5 左右，在 pH 6.0 MES 緩衝液條件下，對 PNPCB 的反應活性之 K_m 為 0.27 mM， k_{cat} 為 66.0 s^{-1} 。

由 Brønsted plot 顯示 ChiNCTU2 為兩步驟水解反應機制-中間體的生成與水解，反應中間體的水解步驟是速率決定步驟。由突變株酵素 E145G 與受質反應過程呈現的雙相動力反應現象 (biphasic kinetic)，顯示有中間體累積，此亦證實中間體水解為速率決定步驟。在 Sodium azide 濃度為 2.5 M 時可增強突變株 E145G 對受質 2,4-DNPCB 的反應速率近 100%，顯示催化反應機制極可能是 anchimeric assistance，其反應中間體為 oxazoline ring。

經胺基酸比對，E145 與 Y213 和 *Serratia marcescens* ChiA (subfamily A) 之 E315 與 Y390 位於相同保留區，經突變後 E145G、E145C 和 E145Q 之 k_{cat} 值較野生株下降 3900 ~ 9100 倍， k_{cat}/K_m 下降 2900 ~ 5300 倍，證實 E145 為 ChiNCTU2 催化作用之重要胺基酸。然而 Y213F 的催化活性 k_{cat} 與 k_{cat}/K_m 與野生株相近，顯示 Y213 對 subfamily B 的 ChiNCTU2 不是參

與水解反應的重要基團，故推論 ChiNCTU2 與 *S. marcescens* ChiA 之結構與催化機制可能不同。



Overexpression and mechanistic study of *Bacillus cereus* NCTU2 chitinase

Student : Huei-Ju Tsai

Advisor : Dr. Yaw-kuen Li

Department of Applied Chemistry
National Chiao Tung University

ABSTRACT

A gene of family 18 chitinase from *Bacillus cereus* NCTU2 was constructed in pET-22b(+) and over-expressed by *E. coli* BL21 (DE3) strain. The full gene encodes a signal peptide (27 amino acids) and a mature protein (333 amino acids). The recombinant protein, designated as ChiNCTU2, was purified from the cytosolic crude extract by a hydrophobic interaction column with homogeneity >90%. LC/MS analysis of the purified protein gave a molecular weight of 36236 Da, which is consistent with the calculated value of the mature protein, indicating the signal peptide can be recognized in *E. coli*. The catalytic activity (k_{cat}) and its Michaelis constant (K_{m}) were characterized to be 66.0 s^{-1} and 0.27 mM, respectively. The Bronsted plot, $\log k_{\text{cat}}$ vs the pK_{a} of leaving phenol, was derived from the catalytic activity of ChiNCTU2 towards a series of arylchitobiosides. The slope of the plot is nearly flat, i.e. $\beta_{\text{lg}} \sim 0$, suggesting that the formation of intermediate is fast step and the breakdown of intermediate is the rate limiting of the reaction. Amino acid multi-alignment revealed that E145 and Y213 are the potential residues mediating the catalytic function of ChiNCTU2. When E145G catalyzed the hydrolysis of 2, 4-dinitrophenyl chitobioside, a biphasic kinetic was observed. The fast step may be attributed to the formation of intermediate and the slow kinetic is simply due to the hydrolysis of intermediate. Sodium azide can serve as the exogenous nucleophile to enhance the breakdown of intermediate. The formation of glycosyl-enzyme intermediate can be ruled out since LC/MS analysis gave the intact molecular weight of E145G. All of these results support the formation of oxazoline intermediate. Mutagenic study showed that the catalytic activities of mutants, E145Q, E145C, and

E145G, were reduced 3900-9100-fold, whereas, the activity of Y213F remained unchanged. This finding confirms the essential role of E145 for ChiNCTU2 catalysis. However, the function of Y213 is distinguished from that of conserved Y390 in *Serratia marcescens*. With the functional inconsistency of Y213 and the discrepancy of amino acid conservation between several family 18 chitinases, we conclude that the protein structure and/or the catalytic mechanism of ChiNCTU2 (subfamily B) is different from other subfamily A chitinase such *S. marcescens*.



誌謝

坐而言不如起而行，但是研究的道路不是只有動手執行，如何從結果中思索出道理才是研究真正的精隨所在吧！

兩年前我懵懵懂懂，懷著僅有的熱誠與興趣，卻堅決地踏上求知的道路，很快地兩年過去了，我問自己獲得了什麼？更多的豁達，更堅忍且強韌面對挫折的心，迎接挑戰的勇氣，以及明白現實與真實的殘酷。我獲得的多過於想像，感謝這兩年來發生的一切，才有現在的我，我將帶著成長與學習的心，坦然迎接未來。

求學與研究的兩年，我由衷地感謝指導教授李耀坤老師在專業領域上對我的訓練與磨練，和面對挫折與困惑等人生態度上的指導與協助，讓我在屢次挫敗後重新站起。

感謝謝有容老師和張大慈老師在口試期間對於論文之詳閱與指正。感謝鍾文聖老師、刁維光老師等系上老師在課堂上傳授的知識以及求學、求知的態度，讓我對於學習有更深的體認。

此外，這兩年來的成長與豐富的生活點滴，要感謝實驗室的眾多學長姐與學弟妹的適時提醒、協助與關心，謝謝至玉學姐、岳進學長、智民學長、可欣學長、勝文學長、成達學長、月雲學姐、心怡學姐、怡昀學姐在我困惑時的指導與解析，金鳳學姐、Mahesh、Keshab、蔓菁、薇伶、小圓、韋宏、阿勝、cup 等人的幫忙與協助，謝謝大家讓我擁有許多難忘的快樂回憶。

我最要感謝是多年來始終無怨無悔支持我的家人，我摯愛的爸爸、媽媽、哥哥與妹妹，謝謝你們的鼓勵、激勵與適時的開導，讓我對於學習更加有動力。感謝我的好朋友-蓉萱、小翠、淑華、珮珊、秀鈴、詠涵、良澤、廷洋、造元以及佳珍學姐等，謝謝你們對我的關心與肯定。最後，感謝天，謝謝老天對我的厚愛！

僅將此論文獻給我心中，最重要的你們！

2004 / 07

目 錄

中文摘要.....	i
英文摘要.....	iii
誌謝.....	v
目 錄.....	vi
表目錄.....	viii
圖目錄.....	viii

第一章 緒論

1-1 幾丁質.....	1
1-1-1 幾丁質簡述.....	1
1-1-2 昆蟲的幾丁質.....	2
1-2 幾丁質酵素.....	2
1-2-1 幾丁質酵素的簡述.....	2
1-2-2 幾丁質酵素的分類與結構.....	3
1-2-3 細菌幾丁質酵素胺基酸序列分析.....	6
1-2-4 Family 18 幾丁質酵素水解反應機制的推測與研究.....	9
1-2-5 <i>Bacillus cereus</i> NCTU2 chitinase (ChiNCTU2).....	14
1-3 胺基酸比對.....	14
1-4 研究目的.....	15

第二章 實驗方法

2-1 藥品與儀器.....	16
2-1-1 一般敘述.....	16
2-1-2 自製藥品與合成化合物.....	17
2-1-3 表現載體的來源.....	19
2-2 幾丁質酵素誘導與純化.....	19
2-2-1 Phenyl Sepharose High Performance (Hydrophobic interaction	

column, HIC) 層析.....	19
2-2-2 Q Sepharose High Performance 層析.....	20
2-3 活性分析.....	20
2-3-1 DNS (3, 5-Dinitrosalicylic acid) 酵素活性測試方法.....	20
2-3-2 以 PNPCB 為受質之活性測定.....	21
2-4 定點突變.....	21
2-5 蛋白質濃度測定.....	22
2-6 酵素分子量與水解反應的產物分析.....	22
2-6-1 電灑式-質譜儀 (Electron-spray ionization MASS, ESI/MASS) 偵測酵素分子量.....	22
2-6-2 電灑式-質譜儀測定酵素水解產物.....	23
2-7 動力學條件.....	23
2-7-1 K_m 和 k_{cat} 之測定.....	23
2-7-2 ChiNCTU2 的最佳 pH 活性 (optimal pH activity) 測試.....	23
2-7-3 ChiNCTU2 在不同酸鹼值下的穩定性 (pH stability).....	24
2-7-4 抑制作用、Sodium azide activation.....	24
第三章 實驗結果與討論	
3-1 藥物合成.....	25
3-2 酵素的過量表現、純化與性質分析.....	27
3-3 反應機構探討.....	33
3-3-1 Brønsted plot	34
3-3-2 <i>N</i> -bromoacetyl chitobiosyl amine (NBACA) 之抑制作用.....	36
3-3-3 ChiNCTU2 之催化作用的重要胺基酸.....	37
3-3-4 反應中間體之探討.....	38
3-3-5 Sodium azide activation.....	40
3-4 本研究之未來工作.....	40
第四章 結論.....	42

第五章 參考文獻.....	44
---------------	----

表 目 錄

表 3-1 ChiNCTU2 對於不同離去基的受質之動力學研究.....	34
表 3-2 野生株 ChiNCTU2 與突變株的活性比較.....	38

圖 目 錄

圖 1-1 幾丁質的化學結構.....	1
圖 1-2 纖維素的化學結構.....	1
圖 1-3 <i>Serratia marcescens</i> ChiA 的 3D 結構.....	5
圖 1-4 以分子動力模擬 (GlcNAc) ₆ 在 <i>S. marcescens</i> ChiA 中，當-1 位置 為 boat 形式時之最低能量構形.....	5
圖 1-5 ChiNCTU2 與細菌幾丁質酵素的作用區組成之示意圖.....	6
圖 1-6 兩步置換水解反應機制.....	9
圖 1-7 推測形成 oxazoline ring 中間體的反應機制.....	11
圖 1-8 Yannis 等提出之 <i>S. marcescens</i> ChiA 的反應機制.....	13
圖 3-1 各類 β -幾丁雙糖衍生物受質的合成流程.....	26
圖 3-2 抑制劑 NBACA 的合成流程.....	26
圖 3-3 胞內粗蛋白經 HIC 層析分離結果.....	27
圖 3-4 ChiNCTU2 經 HIC 層析分離後之 SDS-PAGE 圖.....	28
圖 3-5 ChiNCTU2 經 Q 管柱層析分離之結果.....	28
圖 3-6 ChiNCTU2 由電灑式液相層析質譜分析的分子量.....	29
圖 3-7 膠狀幾丁質與重組 ChiNCTU2 反應的最終產物.....	29
圖 3-8 重組 ChiNCTU2 活性測試的雙倒數圖.....	31
圖 3-9 重組 ChiNCTU2 在不同酸鹼值下的穩定性.....	31
圖 3-10 ChiNCTU2 的最佳 pH 活性測試.....	32
圖 3-11 ChiNCTU2 水解反應的兩步置換機制示意圖.....	33

圖 3-12 Brønsted plot : $\log k_{\text{cat}}$ 對受質離去基之 pK_a 作圖.....	35
圖 3-13 Brønsted plot : $\log k_{\text{cat}}/K_m$ 對受質離去基之 pK_a 作圖.....	35
圖 3-14 β -幾丁雙糖的 epoxide 衍生物.....	36
圖 3-15 E145G 與 2,4-DNPCB 反應 time course.....	39
圖 3-16 (<i>N</i> - thioacetyl-D-glucosamine) ₂ derivatives	39
圖 3-17 (GlcNAc) ₂ -thiazoline	39
圖 3-18 Sodium azide activation 現象.....	40



第一章 緒論

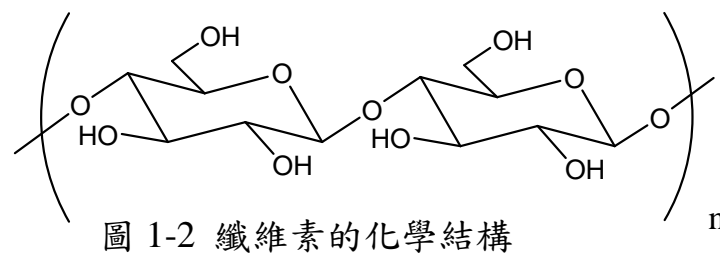
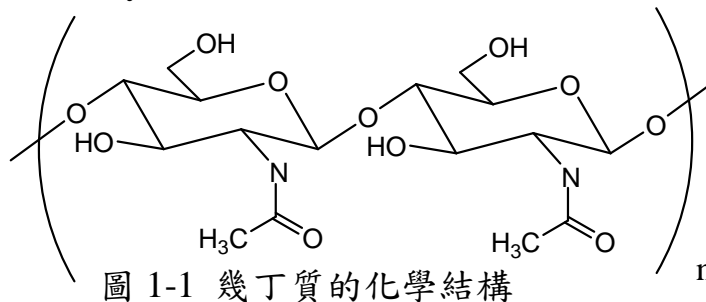
1-1 幾丁質

1-1-1 幾丁質 (Chitin) 簡述

幾丁質 (圖 1-1) 是自然界最豐富且重要的多醣類之一，由單體 *N*-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc, 即 2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucose) 經 β -(1,4) 鍵結而成，為直鏈、堅硬、不可溶的碳水聚合物，是構成多數黴菌細胞壁、昆蟲外骨骼、甲殼類動物殼的主要成份，也存在於軟體動物類、腔腸動物類、線蟲類及原生動物類中^(1,2,3)。

幾丁質結構和纖維素 (圖 1-2) 相似，僅纖維素 C-2 位置上-OH 在幾丁質中被-NHCOCH₃ 取代，皆藉由鏈與鏈之間的氫鍵作用而緊密摺疊，形成穩定形式，具有保護與支持的功能。

幾丁質水解是生物圈內含氮物質的主要代謝過程之一，以平衡其高度的生物合成 (biosynthesis) 與氮的循環。自然界的幾丁質可以被 chitinases (EC 3.2.1.14, family 18、19^註) 與 β -*N*-acetylhexosaminidases (EC 3.2.1.52, family 3、20) 降解為可溶性的 GlcNAc 單體⁽⁴⁾。



註：O-Glycoside hydrolases (醣類水解酵素, EC 3.2.1.-) 是一群水解 glycosidic bond 之酵素，其家族的分類是依據胺基酸序列的相似度。相關來源資料: <http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/>

1-1-2 昆蟲的幾丁質⁽⁵⁾

昆蟲的幾丁質結構經 X-ray 繞射分析推測為一多型態物質 (polymorphic substance)，分為 α -、 β -和 γ -三種晶格修飾 (crystalline modifications) 的幾丁質，主要不同在於幾丁質鏈數的水合 (hydration) 程度。

α -形式約是 20 個幾丁質單鏈組成，且所有幾丁質鏈都呈現 anti-parallel 方向，造成緊密的 microfibrils 摺疊，具有許多的分子內與分子間氫鍵，所以結構很穩定。 β -形式的所有幾丁質鏈都呈現 parallel 排列， γ -形式則是由兩條 parallel strands 伴隨一條 anti-parallel strand。 β -和 γ -形式因為缺乏緊密的摺疊與較少的分子間氫鍵，增加了與水分子的氫鍵作用，較高的水合程度與摺疊緊密程度的降低導致柔軟、柔韌的幾丁質結構。此三種晶格修飾均存在於昆蟲的幾丁質結構中。例如 α -形式普遍存在幾丁質組成的表皮，而 β -和 γ -形式則通常存在於繭的構造中。

此外，幾丁質非結晶型的過渡態 (transient states) 也曾經在黴菌系統中被報導過。

1-2 幾丁質酵素

1-2-1 幾丁質酵素 (chitinases) 簡述

Chitinases (EC 3.2.1.14) 是一種醣類水解酵素，可以催化幾丁質水解，被定義為切斷幾丁質上兩個 GlcNAc 殘基中 C1 與 C4 之間 O-glycosidic bond 的酵素。其廣泛存在於許多有機體中 (即使是沒有幾丁質做為結構組成的有機體)，包括細菌、黴菌、酵母菌、植物、甲殼類動物、節肢動物、脊椎動物等，在各有機體中角色各不相同⁽²⁾。

6)。

黴菌利用幾丁質酵素修飾做為細胞壁重要組成的幾丁質；細菌產生幾丁質酵素分解幾丁質作為氮源與碳源；昆蟲在脫殼時期更是分泌幾丁質酵素分解老舊外骨骼，而在較高等植物中幾丁質酵素的產生被認為是用來防禦黴菌病原體的侵略，此些幾丁質酵素在幾丁質的分解中扮演很重要的生態角色^(2,6)。

幾丁質酵素最方便取得的來源卻是微生物，最被大家所熟知的有 *Aeromonas*、*Serratia*、*Vibrio*、*Streptomyces*、*Bacillus* 等，可生產大量幾丁質水解酵素⁽⁷⁾。

近年來才有哺乳類動物的幾丁質酵素被發現。第一個被發現的人類幾丁質酵素是由吞噬細胞表現，最近幾年更在腸胃中發現豐富的酸性哺乳類動物幾丁質酵素 (acidic mammalian chitinase, AMCCase)，可能是被用來抵抗病原體的入侵⁽⁸⁾。

與幾丁質分解有關的酵素為內切型幾丁質酵素 (endochitinase)、外切型幾丁質酵素 (exochitinase)、endo- β -*N*-acetylglucosaminidase (EC.3.2.1.96) 與 exo- β -*N*-acetylglucosaminidase (EC.3.2.1.52)。內切型幾丁質酵素催化幾丁質長鏈內部的水解，外切型幾丁質酵素則由幾丁質長鏈一端催化水解，放出幾丁二糖 (chitobiose)，endo- β -*N*-acetylglucosaminidase 將 glycoprotein 水解放出 GlcNAc 單糖，而 exo- β -*N*-acetylglucosaminidase 從非還原端水解放出 GlcNAc 單糖⁽⁷⁾。

1-2-2 幾丁質酵素的分類與結構

依據胺基酸序列，幾丁質酵素被歸類在醣類水解酵素 family 18 和 19，兩家族幾丁質酵素的結構與機制均不相同⁽³⁾。

Family 19 幾丁質酵素目前僅發現於植物 endochitinases 與細菌幾

丁質酵素 *Streptomyces griseus* HUT 6037 ChiC，可水解導致構形反轉 (inversion) 的 α -anomeric 組態產物。催化區有豐富的 α 螺旋與 $\alpha + \beta$ 摺疊成分，結構與溶解酵素 (lysozyme) 相似^(3,4)。

Family 18 幾丁質酵素則廣泛分布在其他生物體，包含其他細菌 (endochitinases 與部分 exochitinases)、黴菌、植物、昆蟲、病毒和哺乳類動物，水解產生構形保留 (retention) 的 β -anomeric 組態產物⁽³⁾。根據 Suzuki *et al.* 對於 29 個細菌幾丁質酵素的疏水性群 (hydrophobic cluster) 的分析與研究發現，family 18 細菌幾丁質酵素全部序列的相似度雖然不高，但催化區 (catalytic domain, CaD) 有相同的 $(\beta/\alpha)_8$ 筒狀 (TIM barrel) 構形組成。在起始的六個 β -strands 上有一些保留的胺基酸殘基，包含分別在第三和第四個 β -strand 上的 SXGG 與 DXDXE，SXGG 序列對於催化反應的作用尚不清楚，但 DXDXE 序列被認為位在催化的活性中心，其中 E 作為參與反應的催化酸，在 *Alteromonas* sp. O-7 Chi85 與 *Bacillus circulans* WL-12 ChiA1 研究中曾藉由定點突變導致其活性喪失證實^(2,3)。而活性中心凹槽上的一連串芳香族胺基酸則是用來協助受質與酵素結合^(3,9,10)。

Watanabe *et al.* (1993) 根據催化區胺基酸序列的獨特性質，再將 family 18 原核幾丁質酵素其分為 subfamily A, B, and C，彼此在第七與第八個 β -strand 之間區域差異很大^(2,3)。*Bacillus cereus* NCTU2 ChiNCTU2 屬於 subfamily B，*S. marcescens* ChiA 屬於 subfamily A。

圖 1-3 為 *S. marcescens* ChiA 的 3D 結構⁽¹²⁾，中心位置有八個 β/α 所構成的筒狀結構，這八條 β 摺板經由 α 螺旋連結形成平行排列圍成筒狀柵欄，而 α 螺旋則圍繞在外側，圖右上方的 β 摺板區域為幾丁質鍵結區 (chitin-binding domain, ChBD)。

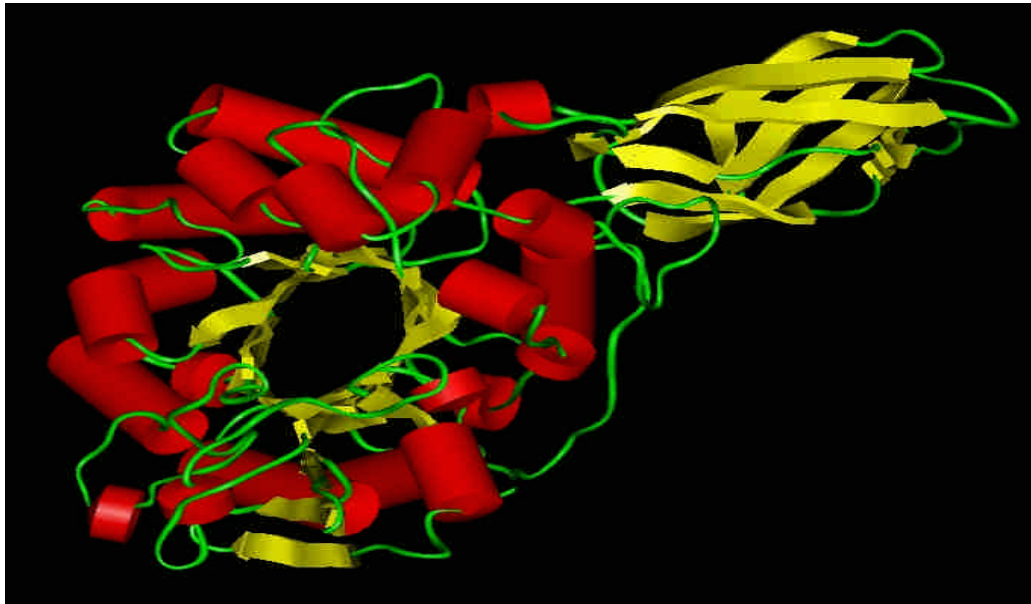


圖 1-3 *Serratia marcescens* ChiA 的 3D 結構⁽¹²⁾

此外，family 18 幾丁質酵素結構上的些微差異，可能導致作用特性的不同，例如酵素與受質之間的鍵結、醣殘基被水解切除的模式、反應機制等，其中由寡醣降解的 time course，分析受質鍵結缺口 (substrate binding cleft) 的自由能分佈可以了解鍵結的穩定性，因而推論醣殘基被水解切除的模式。而活性中心受質鍵結位置 (subsite)，以圖 1-4 為例，從水解切除的位置算起，切下的雙醣為+1、+2，反邊為-1 ~ -4。

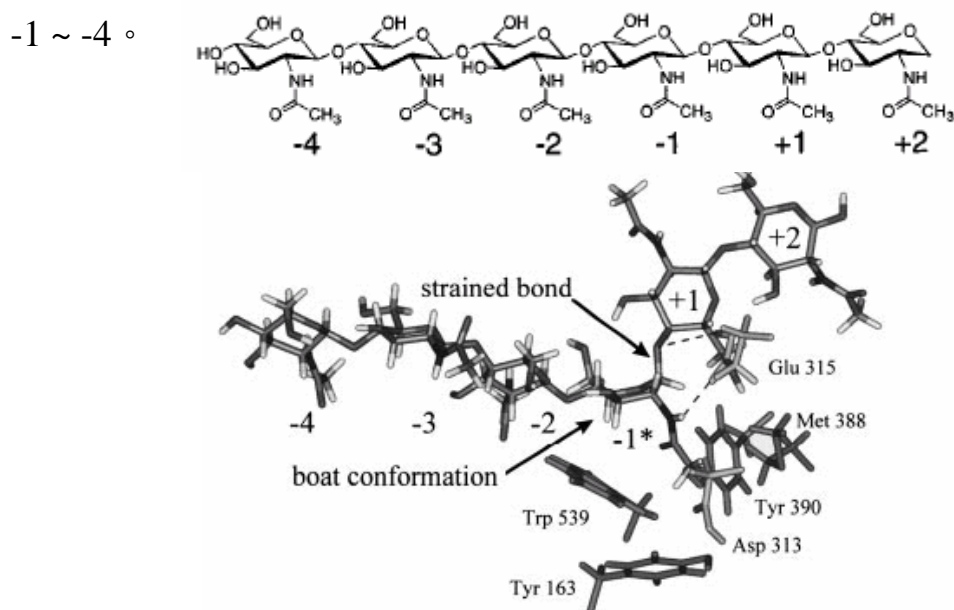


圖 1-4 以分子動力模擬 (GlcNAc)₆ 在 *S. marcescens* ChiA 中，當-1 位置為 boat 形式時之最低能量構形

1-2-3 細菌幾丁質酵素胺基酸序列分析

細菌幾丁質酵素的胺基酸序列顯示，幾丁質酵素通常具有一些常見的作用區域 (functional domains)，包括訊息胜肽 (signal peptide)、催化區與幾丁質鍵結區 (chitin-binding domain, ChBD)，此外還有一些較少見的作用區與 CaD 連接，如 type III fibronectin-like domain (Fn3D)、Pro/Thr rich linker、cadherin-like domain 以及纖維素鍵結區 (cellulose-binding domain, CBD) 等^(2,3)。圖 1-5 為 ChiNCTU2 與其他幾丁質酵素作用區域組成之示意圖⁽¹¹⁾。

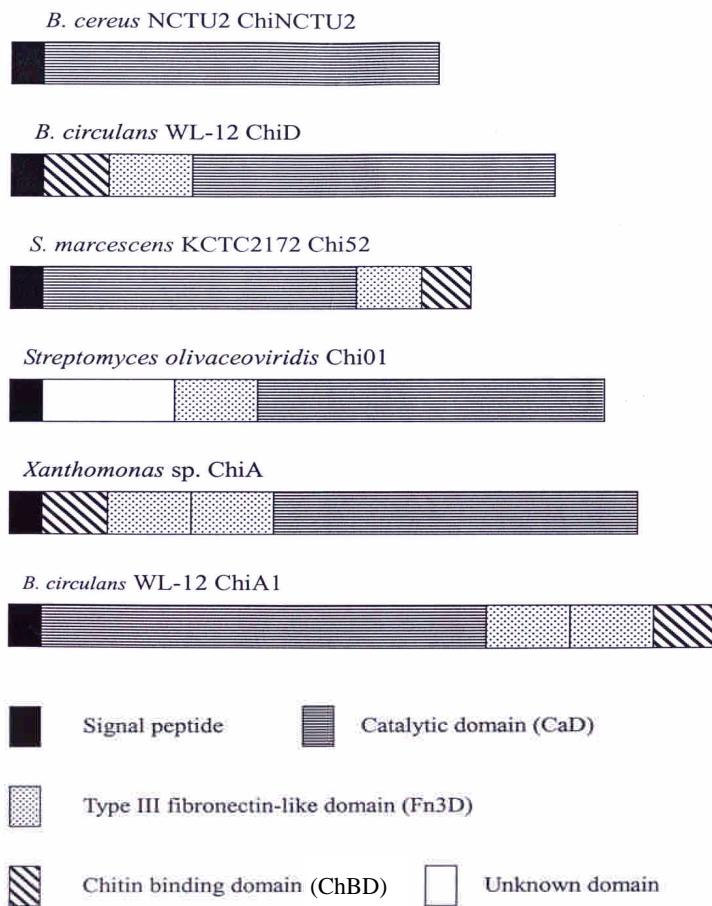


圖 1-5 ChiNCTU2 與細菌幾丁質酵素的作用區組成之示意圖⁽¹¹⁾

訊息胜肽

訊息胜肽為幾丁質酵素分泌所必需，通常具有一個帶正電區、一

個疏水區，和一個斷裂位置 (cleavage site)⁽²⁾。有研究發表指出，外來的含訊息胜肽幾丁質酵素在被轉型至大腸桿菌 (*E. coli.*) 系統中，可成功被運送通過細胞膜，其中包括 *Streptomyces plicatus*, *Aeromonas caviae*, *Aeromonas hydrophila*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter agglomerans*, *Bacillus circulans* 和 *Janthinobacterium lividum* 產生的胞外幾丁質酵素。至於幾丁質酵素是如何將被輸出至 periplasm 或分泌到培養液中仍不甚明白，因為這些幾丁質酵素的訊息胜肽序列並不相似，因此僅能推測訊息胜肽可能具有一些在原核生物的蛋白質分泌可被普遍利用的構形特徵 (conformational feature)⁽³⁾。

催化區

催化區為水解幾丁質中連結 GlcNAc 單體間的 β - (1,4) glycosidic bonds 所需。少數幾丁質酵素僅含訊息胜肽與催化區，而不具有其他的作用區，如 ChiNCTU2。

幾丁質鍵結區

一般研究認為幾丁質鍵結區可與不可溶的幾丁質聚合物結合而有效水解、以增強催化活性，然而，由於此區域不會與可溶的幾丁質寡糖或衍生物鍵結，所以對此類受質的活性不影響。

Bacillus circulans WL-12 之 chitinase A1 的 ChBD_{ChiA1} 為一個緊密的球形結構，核心區域由疏水性殘基與芳香族殘基組成，導致整體結構堅硬而緊密，而 *Watanabe et al.* (1994) 就是由 ChBD_{ChiA1} 的缺失對不溶膠狀幾丁質活性的降低推測 ChBD 與不溶受質鍵結，而促使其水解^(2,3)。但經由 *Serratia marcescens* ChiA 的 ChBD 與 ChBD_{ChiA1} 比對發現，無相似序列存在，因此若要闡明 ChBD 與幾丁質的鍵結機制與在催化活性上扮演的角色，必須有三維蛋白質結構輔助。

雖然 ChBD 對於不溶性受質可增進水解能力，但對於幾丁質酵素

催化活性並不一定需要，所以常見細菌中較高分子量的幾丁質酵素經 post-translational modification (cleavage) 形成一缺乏 ChBD 或 Fn3D 的較低分子量幾丁質酵素，例如 *Serratia marcescens* 2170 chitinase C2 僅含 CaD，是 chitinase C1 切除 C 端的 ChBD 與 Fn3D 所產生；*Serratia marcescens* KCT2172 的 Chi52 也同樣將 ChBD 與 Fn3D 經 proteolytic cleavage 生成低分子量的 Chi35⁽³⁾。

纖維素鍵結區

具有 cellulose-binding domain (CBD) 的 *Bacillus cereus* CH 之 chitinase B 對於不溶膠狀幾丁質比可溶受質有更好的活性，因此 CBD 可能促使著不溶受質的吸附⁽²⁾，所以常被認為與 ChBD 有相似作用。

Erwinia chrysanthemi 的 CBD_{ChiN} 與 *Bacillus circulans* WL-12 之 chitinase A1 的 ChBD_{ChiA1} 整體形式相似，都有芳香族殘基協助酵素與受質鍵結，但線性比對發現 ChBD_{ChiA1} 缺乏 CBD_{ChiN} 上三個暴露在溶劑中的芳香族殘基，其可能與纖維素鍵結有關，因此 CBD 與 ChBD 雖然具有相似的作用角色，但鍵結的機制可能不同。

Cellulases 的 CBDs 在水解反應進行時，推測是藉由集中纖維素表面的 cellulases 而增強活性，此外可能也瓦解部分非共價鍵的交互作用，包括兩鄰近葡萄糖單體之間的氫鍵。部分 cellulases 的 CBD 有相似序列外，*Streptomyces lividans*, *Streptomyces plicatus*, 和 *Streptomyces coelicolor* 的幾丁質酵素也具有類似的區域，特別是某些芳香族殘基的高度保留，經由 *Cellulomonas fimi* 的 β -1,4- glycanase 的 CBD 核磁共振 (nuclear magnetic resonance, NMR) 光譜推測此些芳香族殘基可能與受質的鍵結有關⁽²⁾。此外，也有部份的 CBDs 具有與可溶 cello-oligosaccharides、幾丁質鍵結的能力。

其他作用區

在一些幾丁質酵素 (*Bacillus circulans* WL-12 的 chitinase A1 與 chitinase D)、pullulanases 與 cellulases 的 Fn3D 序列比對發現高度保留區塊，從這些區塊的移除 (deletion) 研究發現 Fn3D 可能扮演著維持 CaD 與 ChBD 之間最理想距離與方位的重要結構角色⁽²⁾。

1-2-4 Family 18 幾丁質酵素水解反應機制的推測與研究

傳統構形保留的醣類水解為兩步置換 (double displacement) 機制 (圖 1-6)，例如 egg-white lysozyme 和 *Flavobacterium* β -Glucosidase⁽¹²⁾，通常牽涉兩個 carboxylates，一個 carboxylate 當作催化反應的一般酸/鹼基 (general acid / base)，於水解反應時先將醣苷鍵上的氧質子化，使形成好的離去基，另一個 carboxylate 作為親核基 (nucleophile) 形成共價鍵中間體或提供離子對以穩定 oxocarbenium 中間體，並輔助離去基離去，當離去基擴散離開活性中心後，水分子進入，行親核性取代反應，得到構形保留產物^(12, 13, 14, 16)。

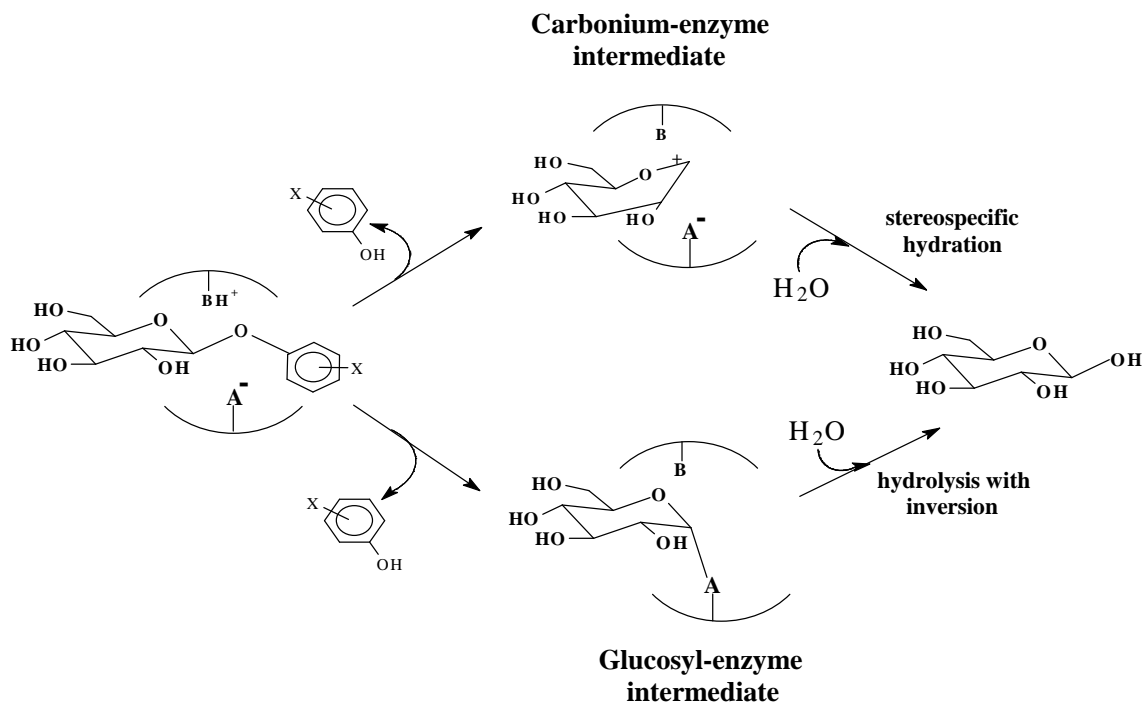


圖 1-6 兩步置換水解反應機制

在過去研究中，同為構形保留的 family 18 幾丁質酵素也被認為應該有如上述的兩步置換水解反應機制，具有兩個參與催化反應的 carboxylate (*Serratia marcescens* ChiA 被推測是 Glu315 與 Asp391)，但是在 family 18 幾丁質酵素的 X-ray 晶體結構中，只發現一個作為一般酸/鹼基的 carboxylate，而沒有用來穩定中間體的第二個 carboxylate 在推測的位置附近，這暗示著中間體可能被其他方法穩定。受質上的 *N*-acetyl group 可能是一種分子內穩定的方法，稱為 anchimeric assistance 或 neighboring group participation，可能經由電荷的交互作用或形成共價鍵 oxazoline 中間體而穩定^(17, 18)。

許多的研究便致力於 family 18 幾丁質酵素水解反應的中間體結構、受質扭曲現象以及酵素與受質在活性中心的鍵結等。其中有分子動力 (molecular dynamics, MD) 模擬在活化位置-1 位置的 boat 形式之 oxocarbenium 與 oxazoline 兩中間體，結果相似，且都較-1 位置的 chair 形式之 oxocarbenium 穩定，因而推測水解反應時，鍵結在-1 位置的 GlcNAc 殘基應該是 boat 形式；ab initio quantum mechanical (QM) calculation 預測 boat 形式的 GlcNAc 質子化可自發導致 anomeric bond 斷裂，得到 oxazoline 中間體；由 Low root-mean-square (RMS) coordinate fluctuation 得知 oxazoline 在-1 位置鍵結緊密，不僅穩定 oxazoline 中間體，更限制溶劑可到達之處，因此水分子做親核攻擊時，僅可得到構形保留的 β -anomer，與實驗看到的結果相同⁽¹⁷⁾，還有由 chitobiose oxazoline 衍生物利用轉糖特性製造長鏈幾丁質的方法^(19, 20)、結晶學研究⁽¹⁷⁾ 與抑制劑 allosamidin 對於 family 18 幾丁質酵素的抑制現象等，以及許多以 oxazoline moiety 化合物對幾丁質酵素的研究都支持著共價鍵 oxazoline 中間體存在之假設。Artificial NAG-thiazoline 對於 *N*-acetyl- β -hexosaminidase 的抑制⁽²¹⁾ 對於

acetamido participation 機制與 oxazoline 中間體的形成提供了更強而有利的證據。圖 1-7 是一般推測受質上的 *N*-acetyl group 參與催化反應形成 oxazoline 中間體的反應機制。

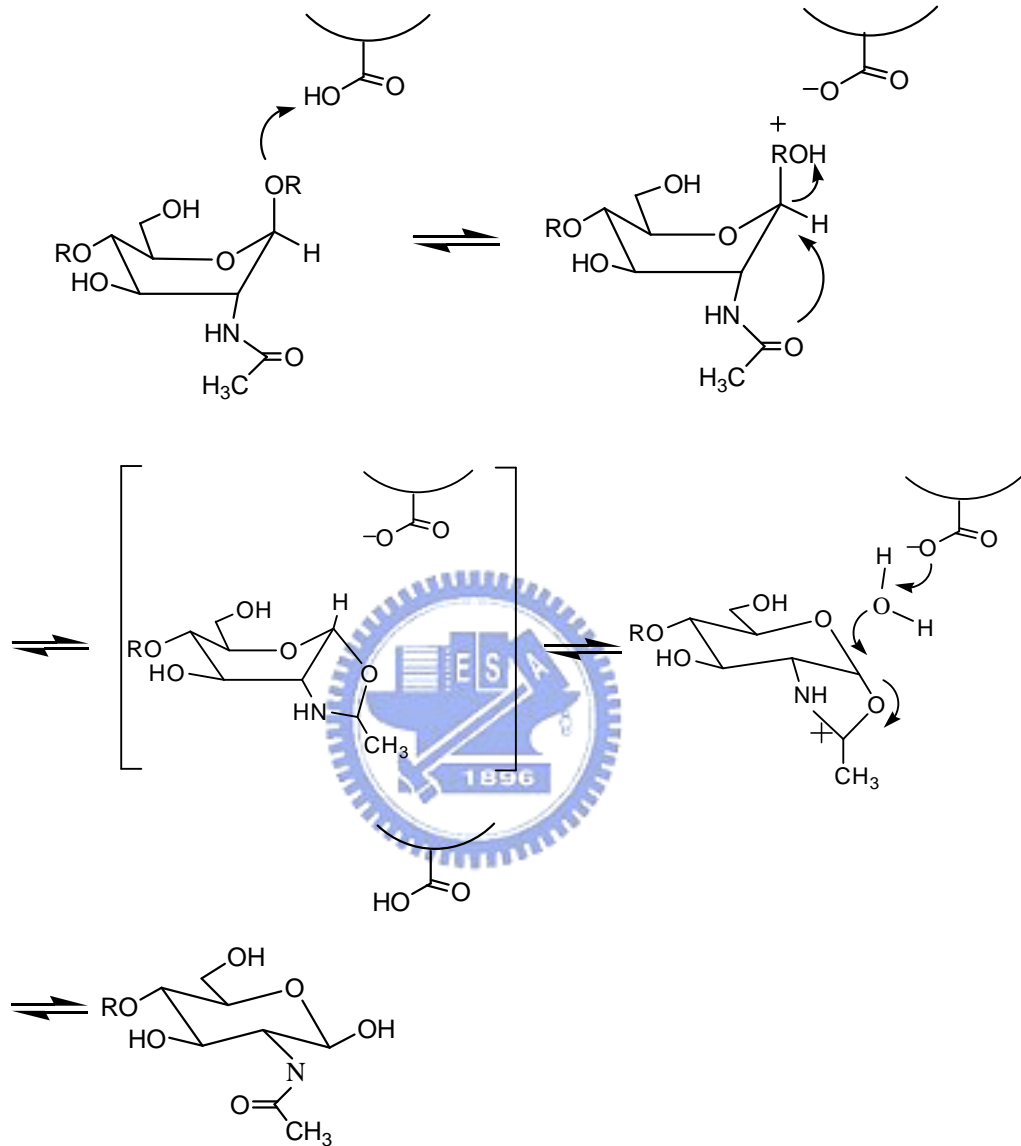


圖 1-7 推測形成 oxazoline ring 中間體的反應機制 ⁽¹²⁾

此種 neighboring group participation 的水解反應機制現象非 family 18 幾丁質酵素專有，在 family 20 的一細菌 chitobiase 的 X-ray 結晶中發現 C2' *N*-acetyl group 在可以用來形成 oxazoline 中間體的位置。而 family 7 的 endoglucanase I (cellulase) 也有類似受質扭曲的現象。

但是 Yannis *et al.* (2001) 由 *S. marcescens* ChiA 的結晶研究⁽⁸⁾ 對於 family 18 水解反應機制的推測有新的看法。由突變株 D313A 與 (GlcNAc)₈ 的結晶中，明確看到連接在活化位置上的寡醣在切除區域 (即 subsites -1 與 +1 的醣單體) 被旋轉以及彎曲，證實過去對於醣類水解時受質會扭曲的猜測，而且在 subsite -1 位置的醣殘基是彎曲成 boat 形式，不同於過去曾有研究提出的 4-sofa 形式⁽⁴⁾。在突變株 Y390F 與 (GlcNAc)₆ 晶體看到 +1 與 -1 醣殘基之間部分斷裂的 glycosidic bond，原本與 Tyr390 鍵結的水分子消失，雙醣明顯鍵結在 +1 和 +2 位置，剩下的受質仍鍵結在 -1 至 -4 位置，但 -1 位置羰基上 O7 與 anomeric C1 距離並不符合預先推測的 oxazoline 中間體。

因此 Yannis 等對於 ChiA 水解反應機制的看法 (圖 1-8) 是 Glu315 先被 Asp313 質子化，所有醣殘基上的 acetamido groups 都朝遠離相連醣鏈的方向，形成一個能量上有利的型態，此時 -1 位置醣殘基上的 acetamido group 朝向胺基酸殘基 313 與 315，Asp313 朝向 Asp311 (family 18 的 DXDXE 保留序列在 *S. marcescens* ChiA 為 311~315)，但部分比率形成朝向 Tyr390 的另種型態，此時羰基上的氧 O7 取代與 Tyr390 的 phenol hydroxyl 形成氫鍵的水分子。

酵素對 -1 醣殘基作用將其由 chair 形式轉換成 boat 形式造成約 8 kcal/mol 的自由能上升，並伴隨著寡醣的旋轉與彎曲，此時水分子與 -1 醣殘基上 acetamido group 以及 Tyr390 形成氫鍵，Glu315 將 +1 醣殘基的 O4 質子化，接著 C1 (-1 醣殘基) -O4 (+1 醣殘基) 之間的 glycosidic bond 斷裂，其中 -1 醣殘基的 acetamido group 朝向 Tyr390，反邊的醣環靠近 Glu315，-1 醣殘基擴散離開後水分子進入，Glu315 抓水分子中的質子，剩下的氫氧基攻擊 -1 醣殘基上 C1，完成反應。

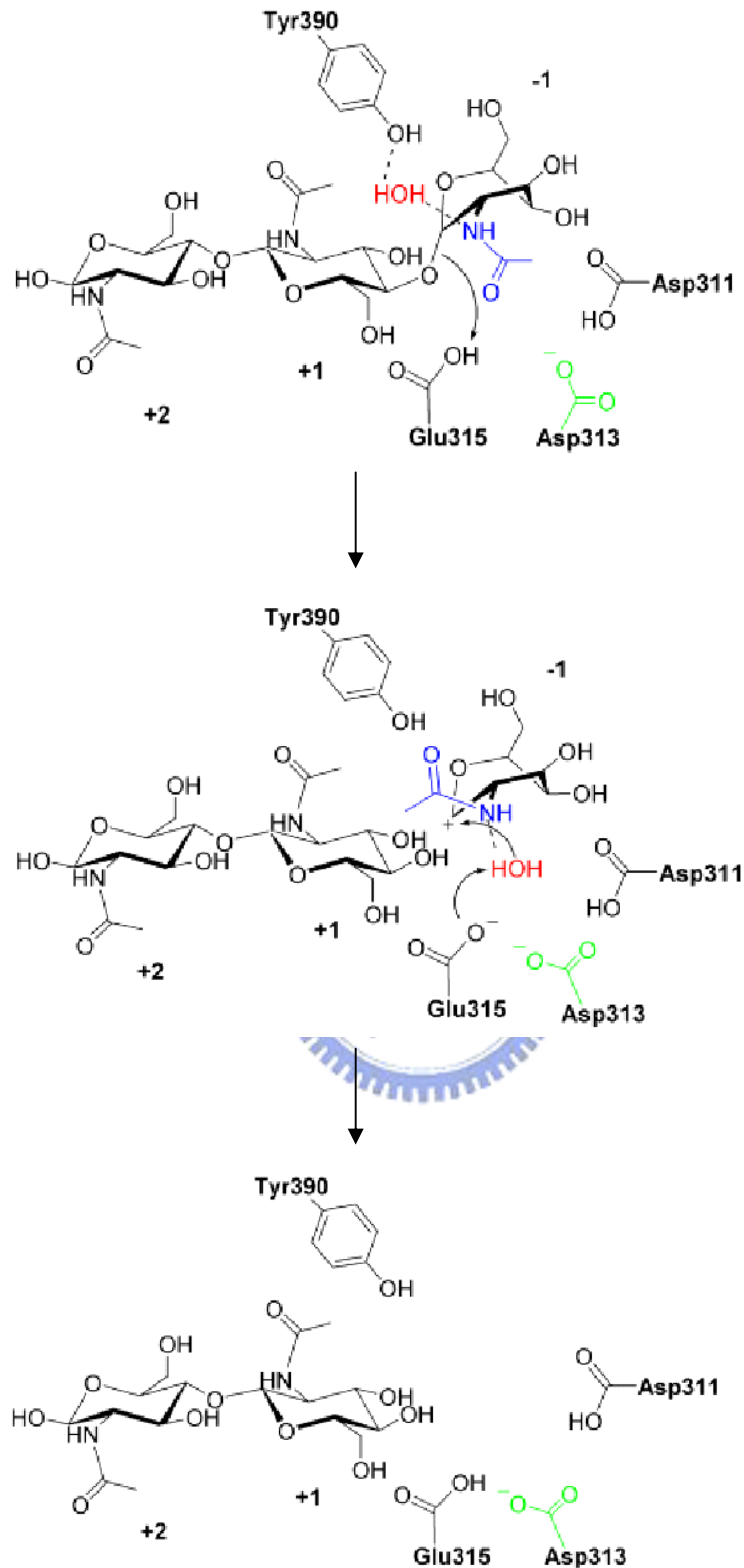


圖 1-8 Yannis 等提出之 *S. marcescens* ChiA 的反應機制

此外，某些情況下在水分子與中間體反應之前，鹼性殘基 Glu 的質子捕捉，引發其他醣鍵結在離去基的位置，產生更長的醣（即轉

糖作用, transglycosylation)。雖然 family 18 有轉糖作用，但此反應為熱力學不利的 (thermodynamically unfavorable)，且當產物稀少時，反應可能不會發生⁽²²⁾。

1-2-5 *Bacillus cereus* NCTU2 chitinase (ChiNCTU2)

ChiNCTU2 為一簡單的幾丁質酵素，僅包含一個 N 端訊息胜肽與 C 端催化區，無 CBD、Fn3D 或其他作用區。ChiNCTU2 之基因共 1083 個核苷酸，相當於 360 個胺基酸，其中前 27 個胺基酸為訊息胜肽，具有一疏水性中心，緊連著 peptidase 辨識序列 Ala-X-Ala，mature protein (成熟蛋白) 分子量為 36235Da。而第 137 個胺基酸序列 FDGIDIDLE 符合 family 18 幾丁質酵素一致的催化序列模式 [LIVMFY]-[DN]-G-[LI VMF]-[DN]-[LIVMF]-[DN]-X-E⁽³⁾。



1-3 胺基酸比對

Bacillus cereus ChiNCTU2 與大小、序列相近的 *Bacillus cereus* Chi36、*S. marcescens* ChiA 以及 6 個細菌幾丁質酵素作序列比對，比對結果於附錄一。

其中在 Yannis *et al.* 對 *S. marcescens* ChiA 晶體研究中指出與 +1 位置糖殘基有交互作用的胺基酸分別是 W275、E315、F316、M388、D391 和 R446，在 6 個細菌幾丁質酵素中幾乎都保留，但在 *B. cereus* ChiNCTU2 與 *B. cereus* Chi36 中除了 E315 外，皆無保留。

而和 -1 位置糖殘基有交互作用的是 Y163、W275、D313、D315、A362、M388、Y390、D391、Y444、R446、W539，在 6 個細菌幾丁質酵素中也幾乎都保留，在 *B. cereus* ChiNCTU2 與 *B. cereus* Chi36 中則是部分保留，保留部分包括 Yannis *et al.* 提出對於反應機制扮演

極重要角色的 Y390，但在 Y390 附近的 M388 與 D391 則未被 *B. cereus* ChiNCTU2 保留，且 *B. cereus* ChiNCTU2 屬於 subfamily B，而 *S. marcescens* ChiA 屬於 subfamily A，因此胺基酸 Y390 對於 ChiNCTU2 水解反應是否有著影響力還是個問號。

1-4 研究目的

對於幾丁質酵素水解反應機制，從模擬、理論計算與抑制作用至晶體觀測的 boat 或 sofa 形式，到 neighboring group participation 的 oxazoline ring 中間體或 Yannis *et al.* 從 *S. marcescens* ChiA 晶體研究中提到的不同論點，這些說法眾說紛紜，本實驗旨於利用實驗室開發合成之人造受質進行動力學研究，藉以探討 ChiNCTU2 之反應機制。此外，我們也將利用定點突變以確認 ChiNCTU2 幾丁質酵素之重要胺基酸殘基。



第二章 實驗方法

2-1 藥品與儀器

2-1-1 一般敘述

藥品：

菌種培養液藥品購自 Merck、Difco 公司

活性測試用藥品及緩衝液購自 Merck、Aldrich。

各式 Kit 購自 GeneMark、Viogene

儀器：

恆溫培養箱 (EYELA NDO-450ND, RISEN refrigerated circulators)

搖動培養箱 (FIRSTEK SCIENTIFIC B602D, S300R, S302R)

UV 吸收光譜儀 (HP 8452A)

高速離心機 (KUBOTA 7820)

電子噴灑式串聯質譜儀 ESI-Q-Tof (Micromass)

超音波震盪器

聚合酶連鎖反應器 (GeneAmp PCR system 2400, 9700)

FPLC system (Pharmacia Biotech FPLC)：

層析管柱

HiTrap Desalting column (Pharmacia, 5 mL)

HiTrap SP column (Pharmacia, 5 mL)

HiTrap Q column (Pharmacia, 5 mL)

HIC (Hydrophobic interaction column)

Q column

2-1-2 自製藥品與合成化合物

自製膠狀幾丁質：

10 公克的幾丁質粉末先以 95% 酒精潤濕，加入濃鹽酸 50 ~ 100 mL，輕晃使幾丁質粉末與濃鹽酸接觸，在室溫下放置進行酸水解反應 1 ~ 2 小時，離心去除雜質與未反應完之幾丁質，取上層液加水稀釋直到沉澱產生，離心取沉澱物，再用水清洗沉澱物數次，以氫氧化鈉中和，然後繼續水洗沉澱物數次去除鹽類，最後以 20 mM pH 7.0 的磷酸緩衝液調整至約 1% 的膠狀幾丁質懸浮液，於 4 °C 下保存。

受質 (β -chitobiosides) 的合成 ^(23, 24) (由實驗室 Mahesh、Keshab 協助提供)：

本實驗室已建立由 *Serratia marcescens* 之幾丁質酵素 (*ChiA_NCTU*) 大量生產幾丁雙糖之方法 ⁽¹²⁾，利用此法可製備大量幾丁雙糖以提供合成 β -chitobiosides 與抑制劑 *N*-bromoacetyl chitobiosyl amine 的反應起始物。

乙醯化幾丁雙糖：將乾燥、純的幾丁雙糖放入 50 mL 的 dichloromethane 中，然後加入 40 g 的 acetic anhydride (Ac_2O) 和 19.6 g 的 triethylamine (TEA) 以及 40 mg 的催化劑 DMAP [4-(dimethyl-amino)-pyridin]，在室溫下攪拌 3 小時反應，之後添加過量 dry diethyl ether，繼續攪拌超過 30 分鐘直到 per-acetyl chitobiose 沉澱出來，將沉澱物過濾，再以過量的 diethyl ether 清洗以移除過量的 TEA 和 Ac_2O ，於室溫下真空乾燥兩小時得到 α -form 與 β -form 的 per-acetyl chitobiose 混合物，以 methanol 再結晶之。

per-acetyl- α/β -chitobiose 之氯化反應：10 mmole 的 per-acetyl- α/β -chitobiose 與 11 mmole 的 phosphorus pentachloride 在 20 mL 的 dry methylene chloride 中攪拌，加入 10~20 μL 的 boron trifluoride

etherate, 攪拌 60 小時之後, 低壓下使溶劑揮發, 得到 crude per-acetyl- α/β -chitobiosyl chloride。

偶合反應: 3 mmole 的 substituted phenol (在 1 mL 的 CH_3CN) 加入攪拌的 1.5 mmole per-acetyl- α -chitobiosyl chloride 與 12 mmole dry Ag_2O 在 10 mL CH_3CN 之混合物, 攪拌 24 小時後, 過濾去除銀鹽, 再將溶劑揮發, 產物用過量 ethyl acetate 溶解, 然後用水清洗 ethyl acetate 層, 以低壓揮發溶劑, 得到含 phenyl 之 per-acetyl- β -chitobioside。

去乙酰化: 將 per-acetyl- β -chitobioside 放入 10 mL dry methanol 中, 在 4 °C、氮氣下加入 1 mL acetyl chloride, 攪拌 overnight, 此時去乙酰化的衍生物慢慢沉澱出來, 低壓去除溶劑, 可得最終產物如下: 2,4-dinitrophenyl- β -chitobioside (2,4-DNPCB)、2,5-dinitrophenyl- β -chitobioside (2,5-DNPCB)、3-nitrophenyl- β -chitobioside (3-NPCB)、4-nitrophenyl- β -chitobioside (PNPCB)、4-cyanophenyl- β -chitobioside (4-CNPCB)、4-chloro-2-nitrophenyl- β -chitobioside (4Cl-2NPCB)。NMR 圖譜於附錄二。

抑制劑的合成⁽²⁵⁾ (由實驗室 Mahesh、Keshab 協助提供)

將乾燥的幾丁雙糖, 於 30 °C 下, 飽和碳酸銨溶液中反應 7 天, 用過量的 DMF 溶解生成的 α/β -chitobiosyl amine, 再以丙酮或 diethyl ether 將其沉澱。

0.25 g 的 α -chitobiosyl amine 在過量 DMF 中攪拌, 將存在 DMF 中的 0.15 g bromoacetic anhydride 緩慢加入, 反應 20 分鐘後, 加入過量的 diethyl ether 將生成的 *N*-bromoacetyl chitobiosyl amine 沉澱。

NMR 圖譜於附錄二。

2-1-3 表現載體來源：

本實驗室由 *B. cereus* NCTU2 選殖(clone)的幾丁質酵素先前已將含訊息胜肽的全長 ChiNCTU2 基因建構於表現載體 pET-22b(+)-*Nde* I 與 *Xho* I 限制酶切位中，且 pelB leader 已被移除，命名為 pET22/chi-sp，本實驗即利用此質體做為後續表現與定點突變 (site-directed mutagenesis) 用。

2-2 幾丁質酵素誘導與純化

質體 pET22/chi-sp 被轉型至大腸桿菌勝任細胞 BL21 (DE3)，在 500 mL 含 0.1 mg/mL Ampicillin 的 LB 培養液中，於 37 °C 培養箱，轉速 120 rpm 下培養約 16 小時。

6500 rpm 轉速離心 500 mL 培養液，以 20 mM pH 7.0 的磷酸緩衝液 5 mL 回溶沉降菌體，使用超音波震盪打破菌體 (冰上進行)，再以轉速 15000 rpm 高速離心取得胞內酵素後，以高速液相層析系統 (fast purification liquid chromatography, FPLC) 進行純化工作。

2-2-1 Phenyl Sepharose High Performance (Hydrophobic interaction column, HIC) 層析

先以蒸餾水流洗 HIC，再用 pH 7.0 含銨鹽的磷酸緩衝液 [20 mM Na₂HPO₄ 含 1 M (NH₄)₂SO₄] 平衡 HIC。

將胞內酵素緩慢注入 HIC 中，利用銨鹽梯度 (1 ~ 0 M) 進行酵素分離。以流速 1 mL/min 流洗 HIC，每三分鐘收集一管流洗液，收集的流洗液分別取樣做活性測試，測得活性的流洗液再以蛋白質電泳膠片 (SDS-PAGE) 估計其均質度 (homogeneity)。

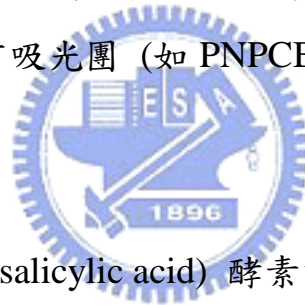
2-2-2 Q Sepharose High Performance 層析

先以 pH 7.0 含食鹽的磷酸緩衝液 (20 mM Na₂HPO₄ 含 1 M NaCl) 清洗 Q 管柱後，再用 pH 7.0 無鹽磷酸緩衝液 (20 mM Na₂HPO₄) 平衡 Q 管柱。

將 HIC 分離後測得活性的流洗液緩慢注入 Q 管柱中，利用 NaCl 鹽類梯度 (0 ~ 1 M) 進行第二次蛋白質分離，以流速 1 mL/min 流洗 Q 管柱，每兩分鐘收集一管流洗液，收集的流洗液分別取樣做活性測試，再以蛋白質電泳膠片估計其均質度。

2-3 活性分析

活性分析主要利用下列兩種方法進行，一為以 DNS 測定還原糖之含量，另一則以具有吸光團 (如 PNPCB) 之人造受質進行動力學分析。



2-3-1 DNS (3, 5-Dinitrosalicylic acid) 酵素活性測試方法

待測樣品中加入少許的 1% 膠狀幾丁質，與等量體積 DNS 試劑於 95 °C 加熱 10 分鐘顯色，測量波長 540 nm 的吸收值。

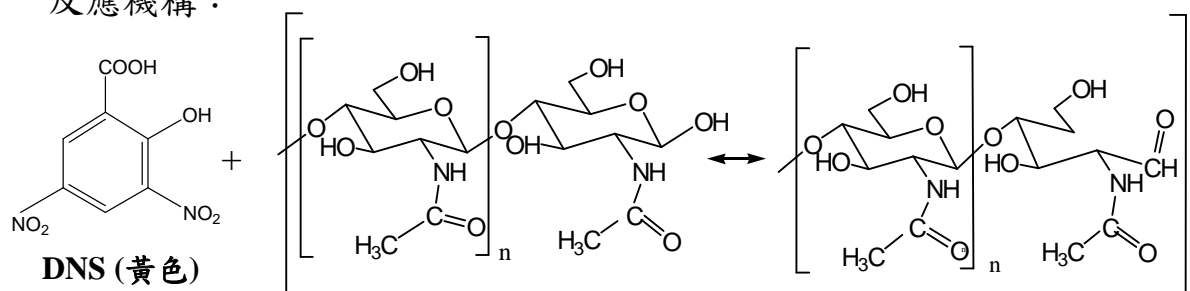
DNS 試劑 (避光): 等量體積的酒石酸鉀鈉溶液與 DNS 溶液混勻。

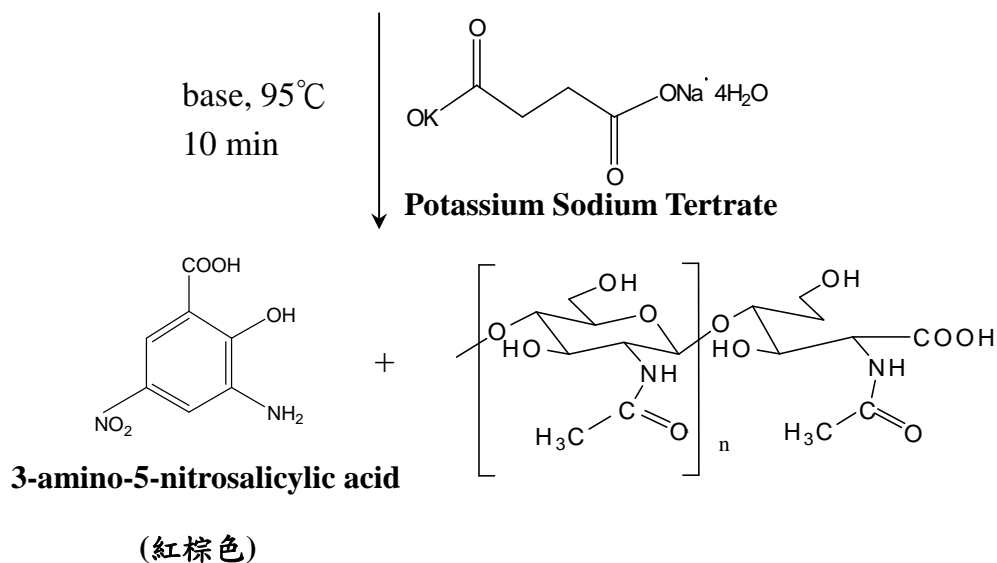
60% (W/V) 酒石酸鉀鈉溶液 (Potassium Sodium Tartrate)

DNS solution : 0.96 % DNS (3,5-Dinitrosalicylic acid)

3.07 % Sodium Hydroxide

反應機構：





2-3-2 以 PNPB 為受質之活性測定

以適量酵素與 PNPB 作用，觀測 p-nitrophenol 之釋放速率，觀測波長為 p-nitrophenol 與 p-nitrophenolate 之等吸光點 (348 nm)^(附錄三) 或 p-nitrophenolate 之最大吸光點 (400 nm)。

2-4 定點突變

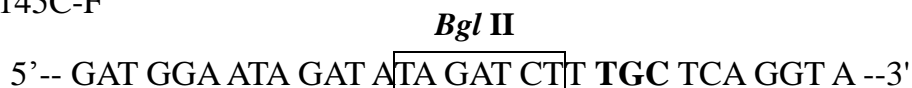
以質體 pET22/chi-sp 為模板，利用 Quik-change 的方法作定點突變，為能快速初步篩選已突變之基因，引子 (primer) 序列中已包含一至兩個不同限制酶酵素之切點，這些切點並未造成額外之胺基酸突變，各引子序列如下：

Primers^註：

E145Q-F



E145C-F



註：限制酶作用區以框標示，突變胺基酸位置以粗體標示

E145G-B

Bam HI

5'-- AAT ACC **GGA TCC** AAG GTC GAT ATC TAT TCC ATC --3'

Y213F-F

Hind III

5'-- CCA ATT ATT **TTC GGA** GTG AAC GAT **AAG CTT** ACA TAC --3'

Y213F-B

Hind III

5'-- GTA TGT **AAG CTT** ATC GTT CAC TCC **GAA** AAT AAT TGG --3'

2-5 蛋白質濃度測定

由 BCA assay 方法建立的蛋白質檢量線^(附錄四) $A_{562}(\text{OD}) = 3.8471 \times 10^{-2} \times [\text{BSA 濃度}] + 8.6419 \times 10^{-2}$ ，配合 μv 吸收光譜，可計算得 ChiNCTU2 在波長 280 nm 下的 $E^{1\%} = 13.9 \text{ OD}$ ，因此爾後測量幾丁質酵素在波長 280 nm 的吸收值便可計算得濃度。

2-6 酵素分子量與水解反應的產物分析

分子量之測定以液相層析質譜分析為主。

2-6-1 電灑式-質譜儀 (Electron-spray ionization MASS, ESI/MASS) 偵測酵素分子量

將少量 (約 5~10 μg) 已純化的酵素注入 C-18 管柱中，以 0.08 mL/min 之流速，先注入 $\text{H}_2\text{O} : \text{CH}_3\text{CN} : 1\% \text{HCOOH} = 80 : 10 : 10$ 混合液流洗出管柱內鹽類，再注入 $(\text{CH}_3)_2\text{CHOH} : \text{CH}_3\text{CN} : \text{HCOOH} = 10 : 10 : 4$ 之混合液將酵素由管柱流洗入質譜儀偵測，所得一系列之質/荷比峰，經換算可得蛋白質分子量。

2-6-2 電灑式-質譜儀測定酵素水解產物

取 1% 自製膠狀幾丁質約 10 ~ 20 μL 與少許 ChiNCTU2 於 37 $^{\circ}\text{C}$ 下反應數小時，使用電灑式-質譜儀分析反應最終產物。

2-7 動力學條件

2-7-1 K_m 和 k_{cat} 之測定

6.38 nM 的 ChiNCTU2 在 50 mM pH 6.5 Na_2HPO_4 緩衝液下，分別和 PNPCB (15.2 μM ~ 0.30 mM, $\Delta \epsilon$: 5088 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, 觀測波長為 400 nm)、2,4-DNPCB (3.0 μM ~ 23.8 μM , $\Delta \epsilon$: 29326 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, 觀測波長為 400 nm)、2,5-DNPCB (18.3 μM ~ 0.22 mM, $\Delta \epsilon$: 4725 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, 觀測波長為 440 nm)、4Cl-2NPCB (48.8 μM ~ 0.29 mM, $\Delta \epsilon$: 2744 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, 觀測波長為 425 nm)、3-NPCB (0.18 mM ~ 0.93 mM, $\Delta \epsilon$: 224 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, 觀測波長為 385 nm)、4CNPCB (18.9 μM ~ 0.11 mM, $\Delta \epsilon$: 3101 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, 觀測波長為 270 nm)，進行水解反應，以 μv 吸收光譜儀觀察適當波長的吸收值變化，計算反應的初始速率 (initial velocity, V_0)。並以雙倒數圖 (double-reciprocal plot) 求 K_m 與 k_{cat} 之值。

2-7-2 ChiNCTU2 的最佳 pH 活性 (optimal pH activity) 測試

以等吸收點 348 nm 做為觀測波長，測量不同 pH 緩衝液下，6.38 nM 的 ChiNCTU2 與 42.5 μM 的 PNPCB 反應之初始速率。

不同 pH 的緩衝液分別為 50 mM NaOAc (pH 3.5、4.0、4.5、5.0、5.5)、50 mM MES (pH 6.0)、50 mM Na_2HPO_4 (pH 6.5、7.0)、50 mM HEPES (pH 7.5、8.0)、50 mM Tris (pH 8.5、9.0)。

2-7-3 ChiNCTU2 在不同酸鹼值下的穩定性 (pH stability)

以等吸收點 348 nm 做為觀測波長，將定量 ChiNCTU2 置於不同 pH 緩衝液中，在第 1、15、35、65 分鐘時取出與 59.0 μ M 的 PNPCB 在 50 mM pH 6.0 MES 中反應，測量反應的初始速率。(ChiNCTU2 之最終濃度為 8.57 nM)

不同 pH 的緩衝液為 50 mM NaOAc (pH 3.5、4.0、4.5、5.5)、50 mM Na₂HPO₄ (pH 6.5)、50 mM HEPES (pH 7.5、8.0)、50 mM Tris (pH 9.0)。

2-7-4 抑制作用、Sodium azide activation

緩衝液下，固定濃度的 PNPCB 與 ChiNCTU2 在不同濃度的抑制劑或 Sodium azide 下進行反應，測量反應初始速率。

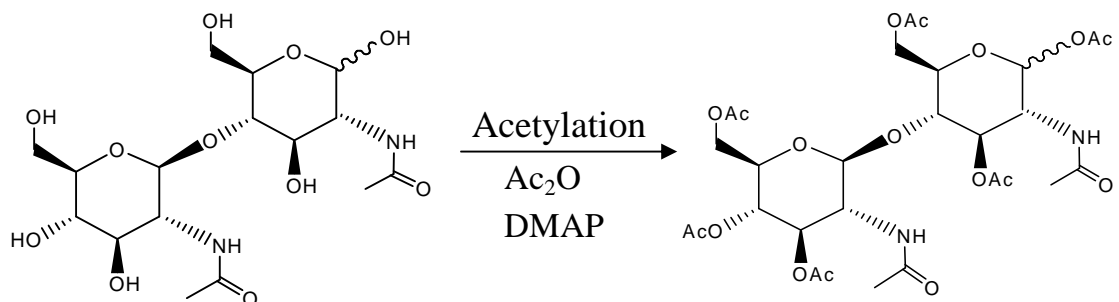


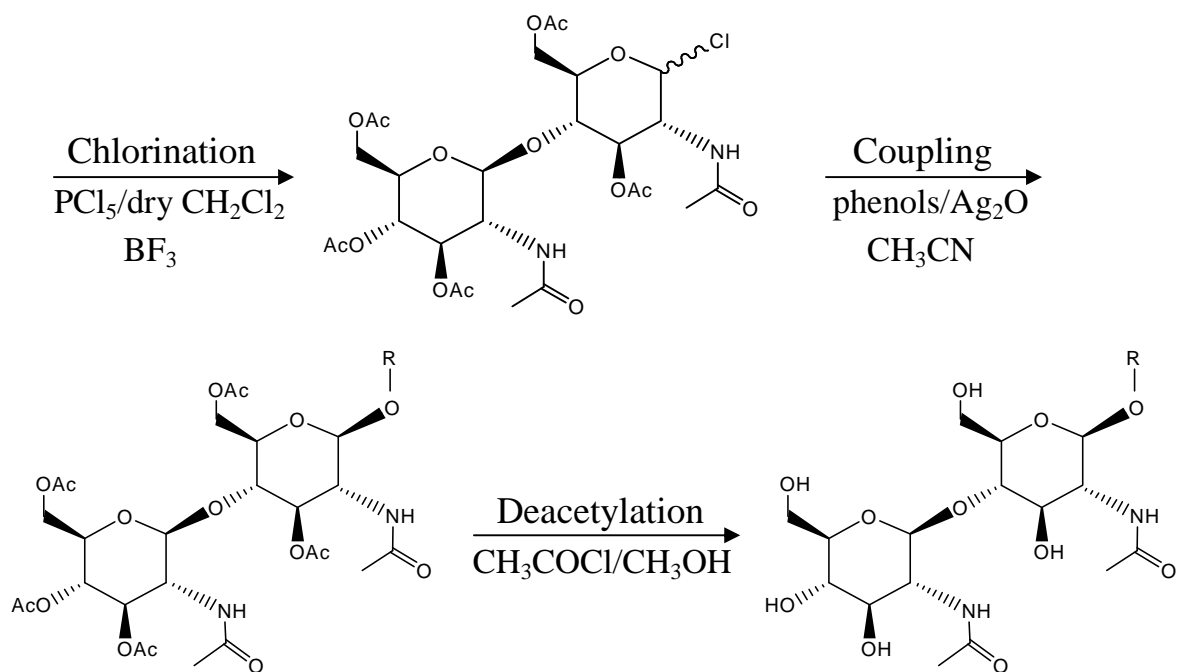
第三章 實驗結果與討論

3-1 藥物合成

幾丁質酵素的表現、純化和性質研究等已有相當多之文獻報導，但是關於反應機制的探討卻不多，目前對於此酵素反應機制的推測大都利用結晶、模擬、NMR 為主而以酵素動力學為輔。雖然酵素動力學可以較深入解析反應機制過程，但是由於最常使用的受質（膠狀幾丁質、glycol 幾丁質等）和分析方法，如 DNS，多半靈敏度不高，因此相當不易測得可信之動力學數據。人造受質（含吸光團）是研究動力學最快速而有效的方法，以 p-NP-(GlcNAc)_n [4-nitrophenyl-(N-acetyl-D-glucosamine)_n] 和螢光標識的 4-MU-(GlcNAc)_n [4-methylumbelliferyl-(N-acetyl-D-glucosamine)_n] 最常被使用。然而此等反應受質價格極為昂貴，且種類有限，因而大大限制了反應動力學之測定。

近年來，由於本實驗室已開發完成大量生產幾丁雙糖之系統⁽¹²⁾，使得利用此昂貴的雙糖進行各式人造受質的合成變成可行。合成反應是先將幾丁雙糖乙醯化得到 per-acetyl- α/β -chitobiose 之混合物，再將之氯化成 per-acetyl- α/β -chitobiosyl chloride⁽²³⁾，經偶合反應後可得到具各種苯酚離去基之受質前驅物⁽²⁴⁾，最後去乙醯化得到各類 β -幾丁雙糖衍生物之受質，產率約 30~45%，合成流程如圖 3-1。這些受質對於後續的動力學研究與反應機制探討提供很大的幫助。





**R : 4-cyano phenyl, 3-nitro phenyl, 4-nitro phenyl,
2,5-dinitro phenyl, 4-chloro2-nitro phenyl,**

圖 3-1 各類 β -幾丁雙糖衍生物受質的合成流程

另外，我們還利用幾丁雙糖合成出可能具有活性中心親和性之不可逆抑制劑 *N*-bromoacetyl chitobiosyl amine (NBACA)⁽²⁵⁾。合成反應是將幾丁雙糖經 amination 生成 chitobiosyl amine，再經偶合反應生成 NBACA，產率約 80~90%，合成流程如圖 3-2 所示。

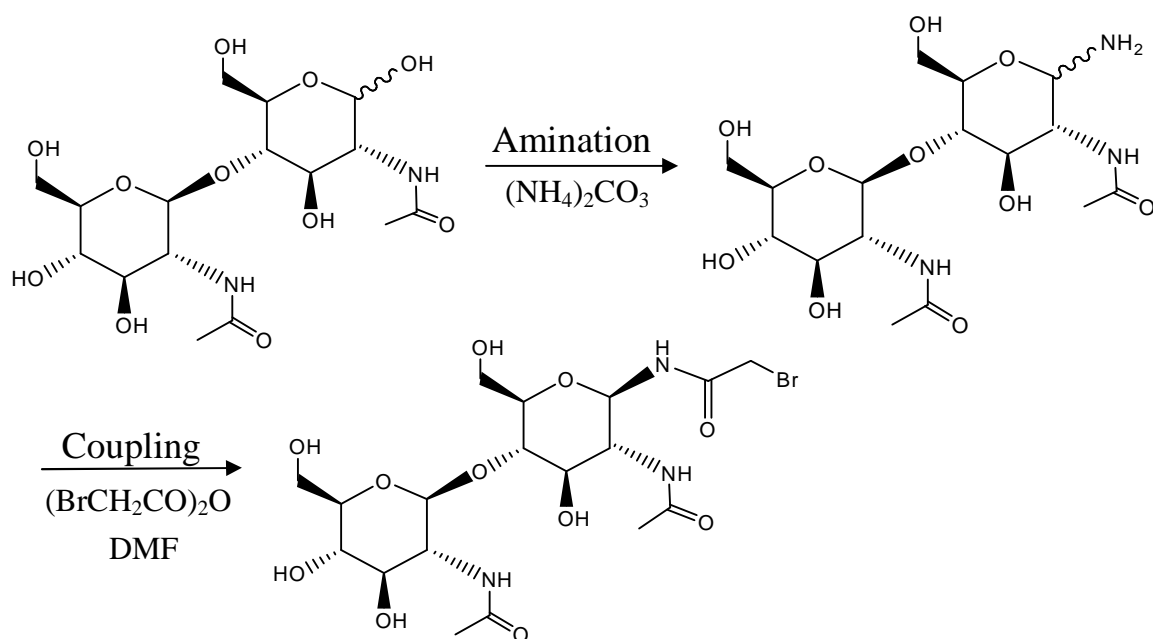


圖 3-2 抑制劑 NBACA 的合成流程

3-2 酵素的過量表現、純化與性質分析

至目前為止已知有三株 *Bacillus cereus*^(2,3,11) 之幾丁質酵素被選殖出來，但皆尚未被成功表現出有活性的重組酵素。過去，本實驗室曾嘗試將去除訊息胜肽之 ChiNCTU2 (成熟蛋白) 建構於 pRSET A 表現載體中，但表現所得的酵素為包涵體 (inclusion body)，此包涵體以尿素溶解後進行 rescue，仍未成功恢復酵素活性。

在本研究中，我們將含訊息胜肽的全長 ChiNCTU2 基因建構於載體 pET-22b(+) 進行表現，幸運的，可表現出大量具有活性的重組酵素。以下簡述其純化過程。

菌體經離心、超音波震盪打破、以及磷酸緩衝液回溶之前處理所得的胞內粗蛋白可以疏水性層析管柱 (HIC) 分離，其層析圖如圖 3-3 所示，其中含酵素活性之流洗液以 100% 水 (不含鹽類) 沖提出來，由 SDS-PAGE 分析 (圖 3-4) 可知，其均質度已達 90% 以上。

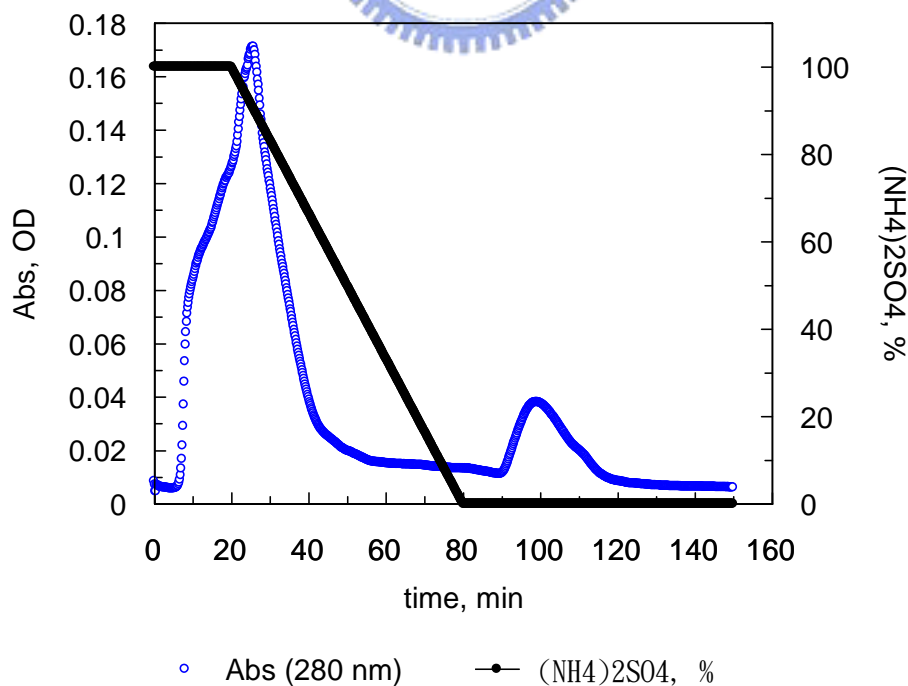


圖 3-3 胞內粗蛋白經 HIC 層析分離結果，酵素活性出現在第 90 ~ 120 分鐘之流洗液

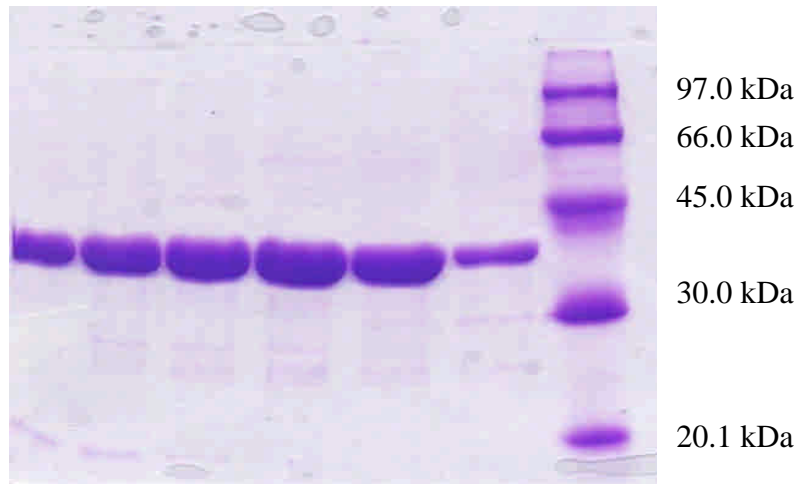


圖 3-4 ChiNCTU2 經 HIC 層析分離後之 SDS-PAGE 圖

為去除少許之不純物，上述分離所得之流洗液再以陰離子層析管柱 (Q sepharose) 進一步純化，如圖 3-5 所示。由流洗液的活性測試得知 ChiNCTU2 與 Q sepharose 沒有作用力，而在無鹽之流洗液下被沖提出。此層析管柱雖可除去少部分不純物，但對酵素之純度未明顯提升因此後續之酵素純化僅以 HIC 進行。

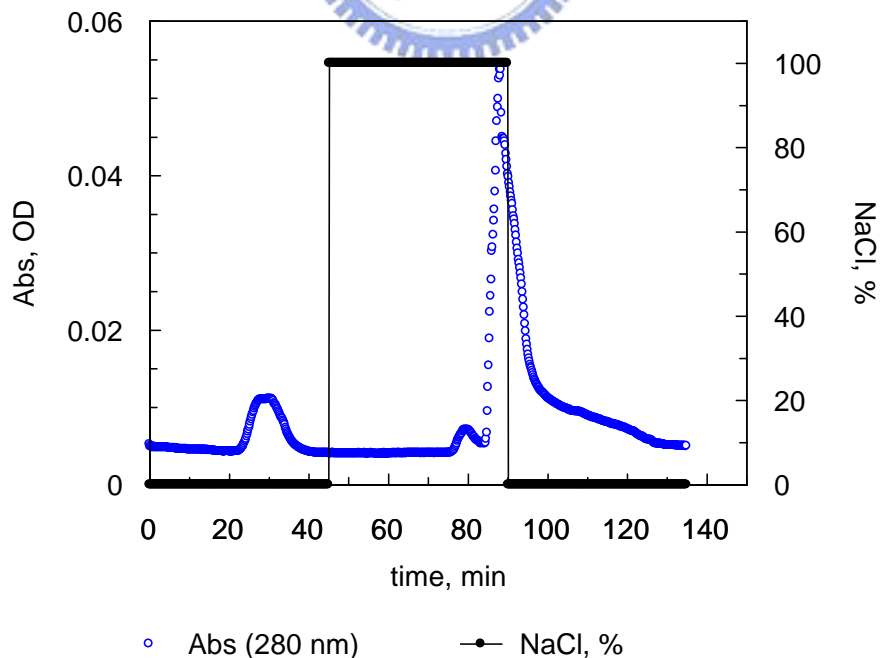


圖 3-5 ChiNCTU2 經 Q 管柱層析分離之結果，活性出現在第 20 ~ 40 分鐘之流洗液

由 SDS-PAGE 之分析可估計重組 ChiNCTU2 分子量約為 36 kDa，經由電灑式液相層析質譜儀 (LC/ES/MS) 分析，進一步確認其分子量為 36236 Da (圖 3-6)，與成熟蛋白的理論計算值 36235 Da 吻合，可見訊息胜肽已被切除。本研究中此重組 ChiNCTU2 同時存在大腸桿菌 BL21 (DE3) 之胞內與胞外，均有明顯活性，故此原屬於 *B. cereus* 之訊息胜肽亦可被大腸桿菌 BL21 (DE3) 辨識，若進一步研究或許可以利用此訊息胜肽開發大腸桿菌胞外表現系統。

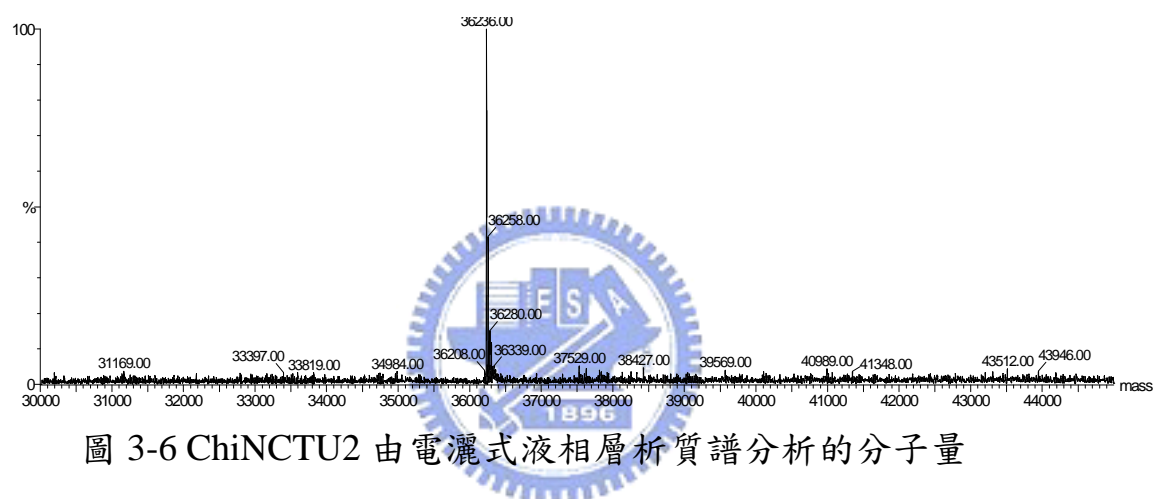


圖 3-6 ChiNCTU2 由電灑式液相層析質譜分析的分子量

由重組酵素與膠狀幾丁質反應的最終產物為幾丁二糖 (圖 3-7)，顯示其為 exo-type 幾丁質酵素，此與由 *B. cereus* 純化所得之 ChiNCTU2 相同。

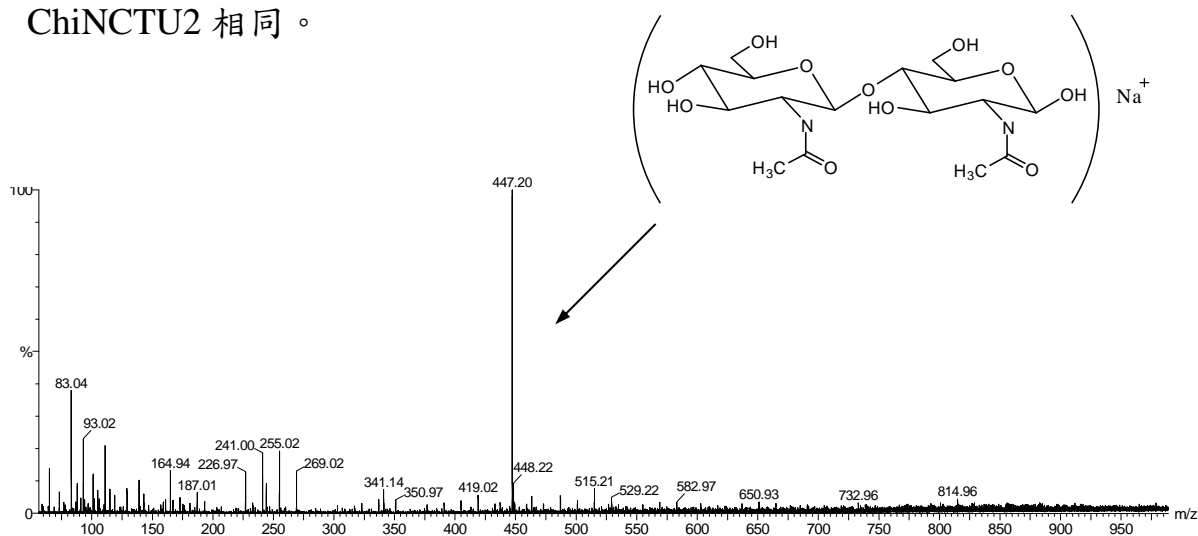


圖 3-7 膠狀幾丁質與重組 ChiNCTU2 反應的最終產物

重組酵素之性質研究

為進一步深入探討重組 ChiNCTU2 的催化性質與反應機構，我們首先測試其一般性質。

由研究顯示重組 ChiNCTU2 有不錯的穩定性，於 4 °C 下可保存數個月而不至於喪失活性。其 Michaelis-Menten 參數可以雙倒數作圖法，圖 3-8 所示，算出 K_m 為 0.27 mM， k_{cat} 為 66.0 s^{-1} 。另外，室溫下，重組 ChiNCTU2 在不同酸鹼值中，亦維持相當好穩定性。圖 3-9 是重組酵素於 pH 3.8 ~ 9.0 緩衝液中保存一小時之活性測試，其活性均可維持 80% 以上。最佳反應 pH 值約在 pH 5.5 左右，見圖 3-10，

有趣的是當 $\text{pH} > 7$ 與 $\text{pH} < 4$ 時，此酵素活性降到 50% 以下，而完整的酵素活性與酸鹼度關係呈現一鐘型曲線 (bell-shaped curve) 趨勢，且由 $\text{p}K_1 = 4.26 \pm 0.05$ ， $\text{p}K_2 = 6.81 \pm 0.04$ 所操控。由一般動力學理論得知此鐘型曲線意味酵素活性由兩個顯示 $\text{p}K_a$ (apparent $\text{p}K_a$) 操控，在許多酵素研究中，此兩個 $\text{p}K_a$ 反應出兩個胺基酸殘基在催化中扮演重要角色，當此兩胺基酸均處於質子化 (EH_2) 的狀況，即低 pH 值之下，酵素活性下降，同樣的，當其皆為去質子化時 (E^{2-})，即高 pH 值下，酵素為無活性狀態，當其一為質子化而另一個為去質子化時 (EH^-)，酵素才是真正活化的。



但這與一般推測 family 18 幾丁質酵素僅有一個在水解反應中做為 general acid/base 胺基酸的理論不符。可能的原因是此酵素有著與過去推測不同的反應機制，或是酵素部分胺基酸上的側鏈因為 pH 變化造成整體結構的些微改變，以致於活性的喪失。此鐘型曲線所顯示

兩 pK_a 是整體酵素在不同酸鹼度中表現出來的總活性變化趨勢，並非反應特定之胺基酸的酸鹼解離現象。而真正的原因仍需進一步探討。

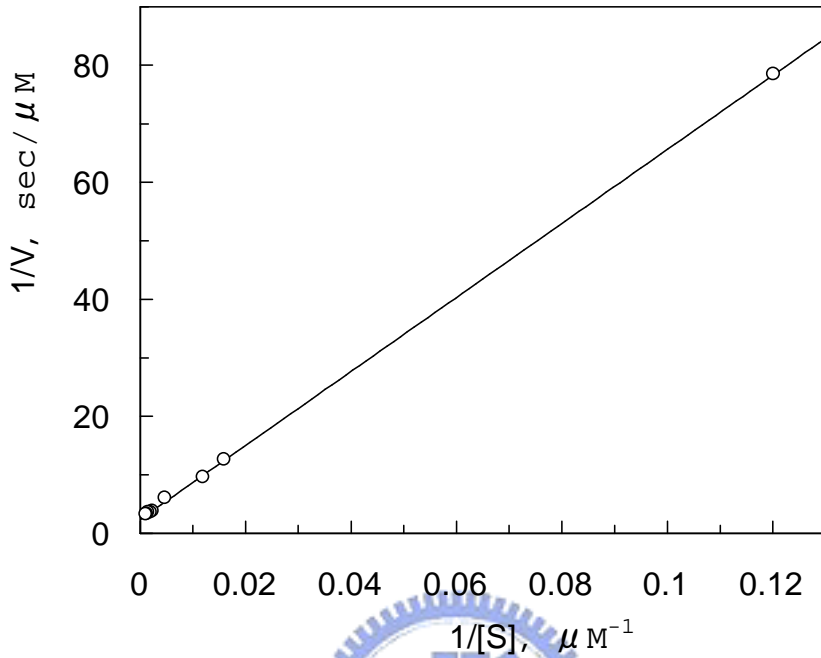


圖 3-8 重組 ChiNCTU2 活性測試的雙倒數圖

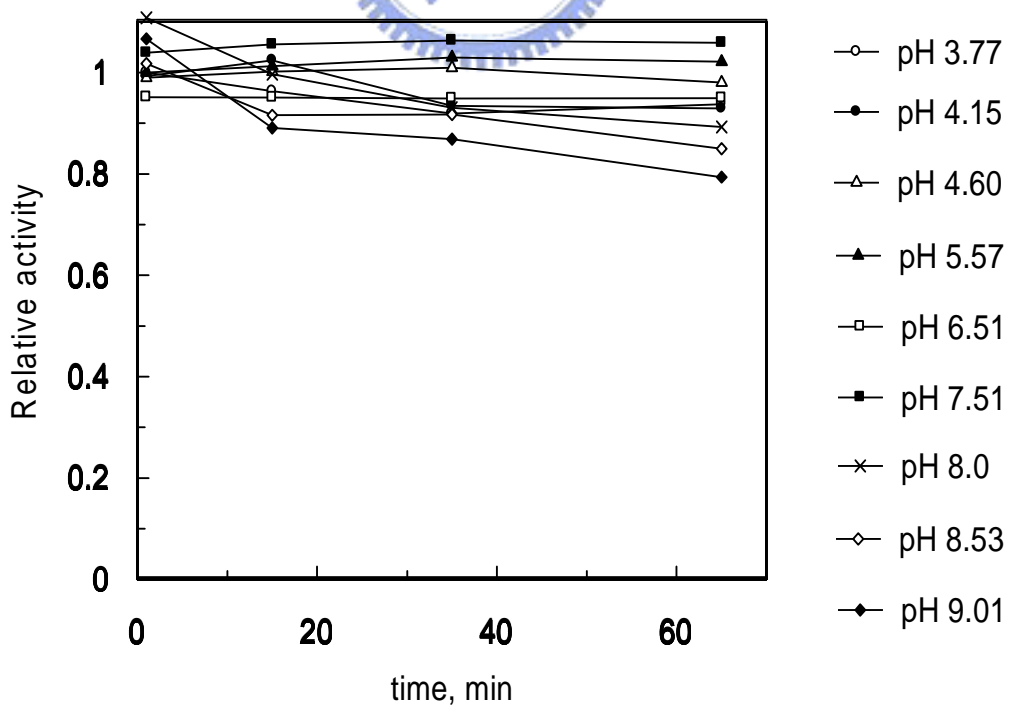


圖 3-9 重組 ChiNCTU2 在不同酸鹼值下的穩定性

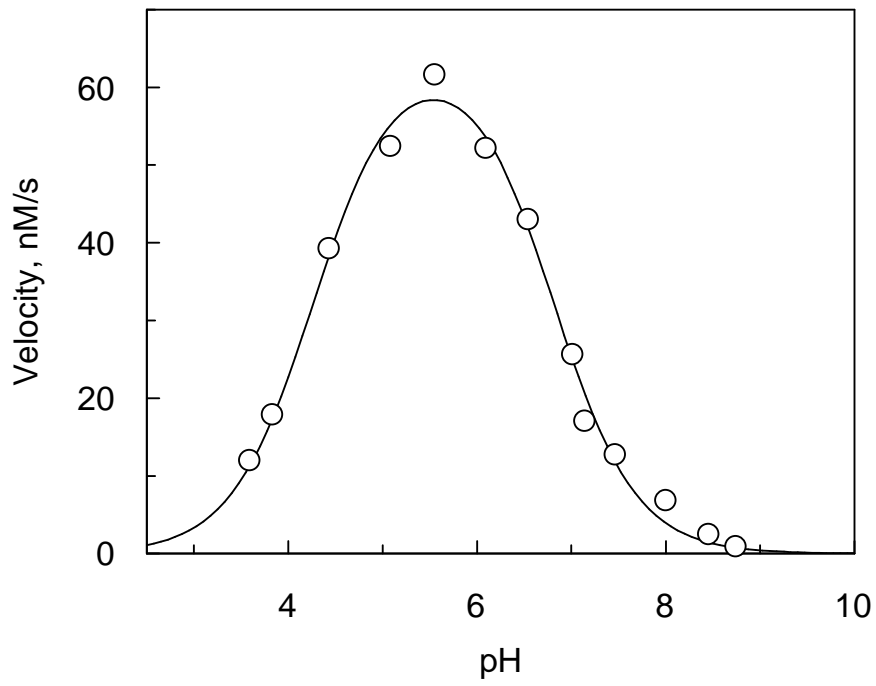


圖 3-10 ChiNCTU2 的最佳 pH 活性測試



3-3 反應機構探討

已知 family 18 之幾丁質酵素為保留型酵素 (retention enzyme)，其水解作用機制為雙步驟置換反應，如圖 3-11 所示，反應過程中先是中間體的生成 (formation)，之後水解中間體完成反應 (breakdown)，而反應中間體的結構目前仍未知。

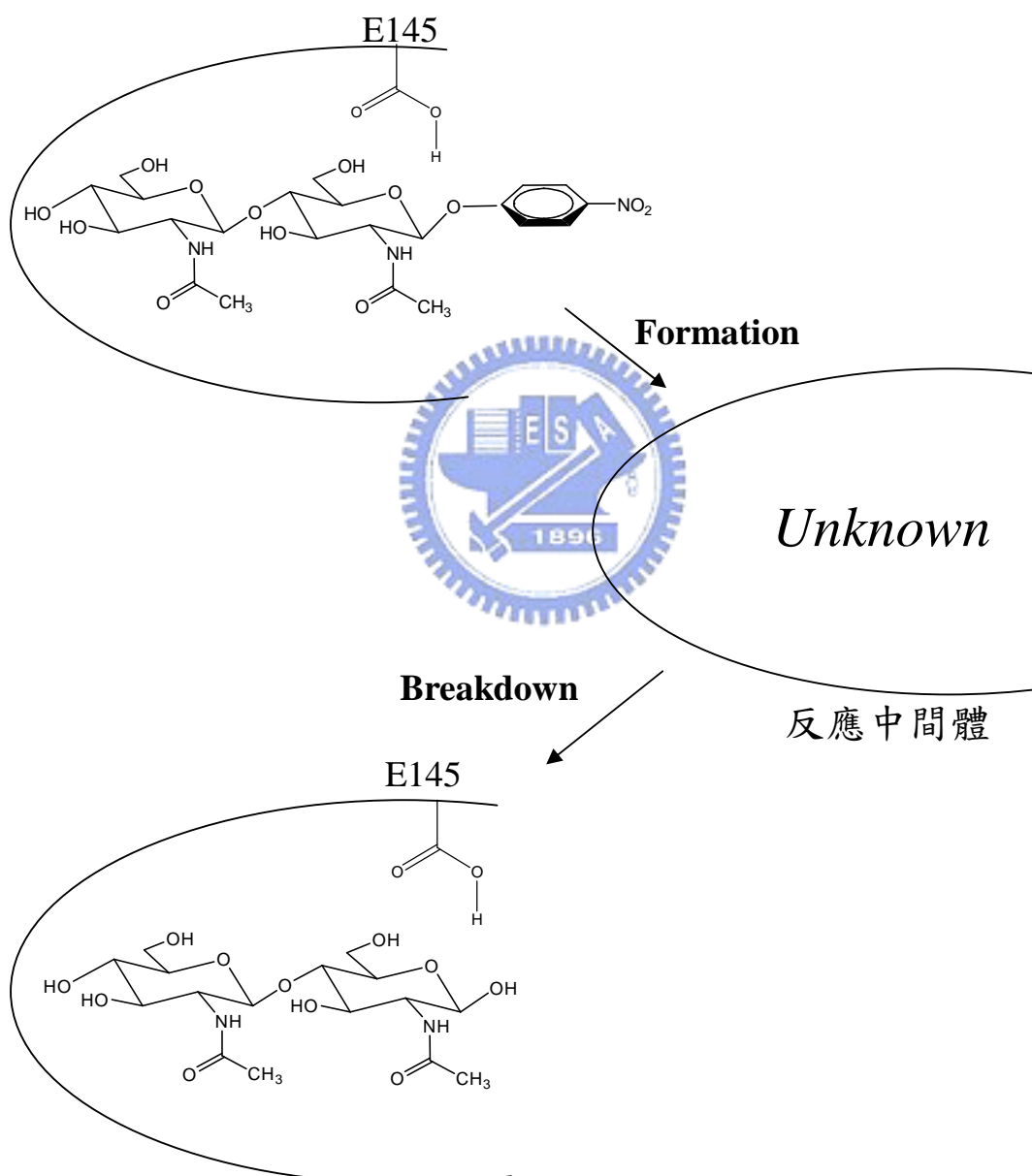


圖 3-11 ChiNCTU2 水解反應的兩步置換機制示意圖，
其中受質以 PNPCB 為例

3-3-1 Brønsted plot

由不同 β -chitobioside 反應受質與 ChiNCTU2 的活性測試結果 (表 3-1)，得到的 $\log k_{\text{cat}}$ 與 $\log k_{\text{cat}}/K_m$ 對不同離去基之 pK_a 作圖 (圖 3-12、3-13)，結果為皆呈一水平線之 Brønsted plot，這代表水解反應速率不受離去基 pK_a 的影響，所以離去基離去而形成反應中間體的步驟不是催化反應之速率決定步驟 (rate-limiting step)，而水分子參與水解反應中間體才是此反應的速率決定步驟。

如果 breakdown 速率更慢，則反應中間體的累積似乎是有機會發生的，若能因而觀測到反應中間體，對於反應機制的推測會是一大突破。

表 3-1 ChiNCTU2 對於不同離去基的受質之動力學研究

條件：50 mM pH 6.5 之 Na_2HPO_4 緩衝液

phenol substituent	pK_a	K_m (mM)	k_{cat} (s^{-1})	$\log k_{\text{cat}}$	$\log k_{\text{cat}}/K_m$
2,4-dinitro	3.96	0.89	97.67	1.99	5.04
2,5-dinitro	5.51	0.40	111.9	2.05	5.44
4-chloro-2-nitro	6.45	0.55	57.07	1.76	5.01
4-nitro	7.18	0.79	117.6	2.07	5.17
3-nitro	8.39	1.28	97.04	1.99	4.88
4-cyano	8.49	0.31	48.18	1.68	5.19

$$k_{\text{cat}}/K_m : \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$$

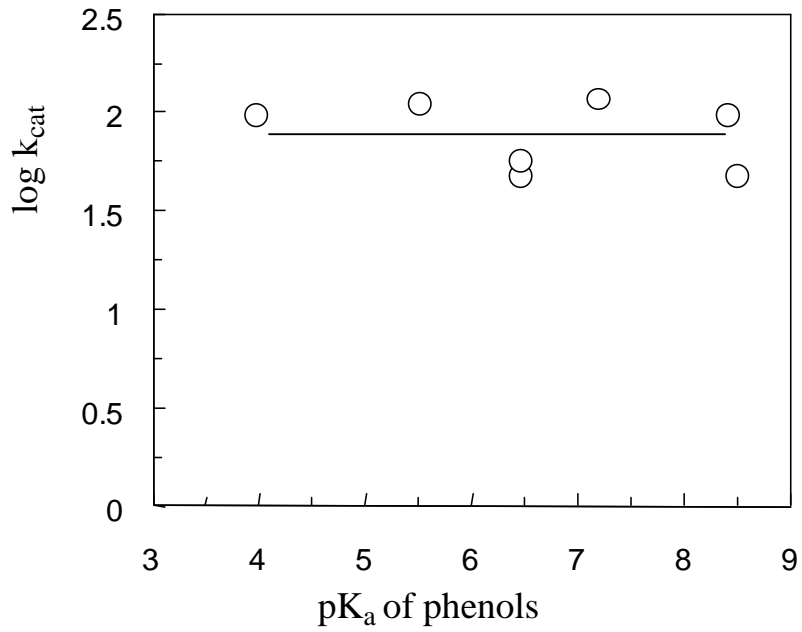


圖 3-12 Brønsted plot : $\log k_{cat}$ 對受質離去基之 pK_a 作圖

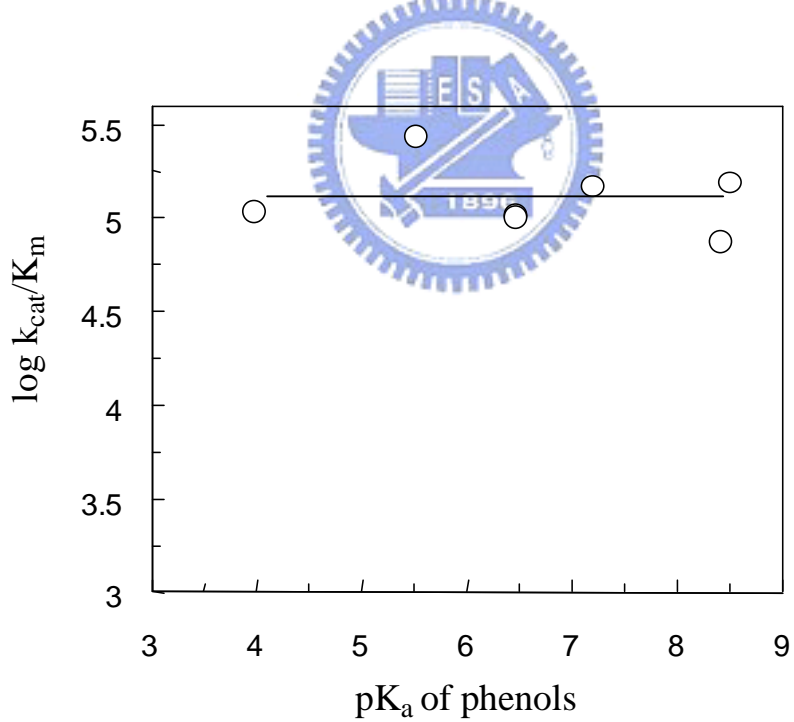


圖 3-13 Brønsted plot : $\log k_{cat}/K_m$ 對受質離去基之 pK_a 作圖

3-3-2 *N*-bromoacetyl chitobiosyl amine (NBACA) 之抑制作用

N-bromoacetyl glycosyl amine 已被成功用以標識許多醣類水解酵素的重要胺基酸殘基，如本實驗室曾以 *N*-bromoacetyl glucosyl amine 為活性中心親和抑制劑，結合 LC/MS/MS 胜肽定序技術而成功地將 family 3 之 β -glucosidase 的一般酸/鹼基 (general acid/base) 胺基酸明確的鑑定出來⁽¹⁶⁾。在本研究中，我們也企圖利用此類化合物 *N*-bromoacetyl chitobiosyl amine (NBACA) 對 ChiNCTU2 進行標識，可惜的是，以 25 mM NBACA 和 ChiNCTU2 作用 3 天後，以 LC/MS 分析 ChiNCTU2 分子量並未發現有親和性標識的現象。為進一步分析所使用的 NBACA 是否可有效與 ChiNCTU2 結合，我們進行可逆抑制作用的研究，由實驗結果顯示 NBACA 是 ChiNCTU2 的可逆抑制劑，其 K_i 值為 0.64 mM，因此在 25 mM 濃度下，估計所有 ChiNCTU2 均與 NBACA 結合，由此可見 NBACA 無法與 ChiNCTU2 進行親和性共價反應。另一類含 epoxide 之幾丁雙糖衍生物，如圖 3-14 所示，或許有機會當作 ChiNCTU2 之親和性標識劑，目前我們已著手合成此類化合物。

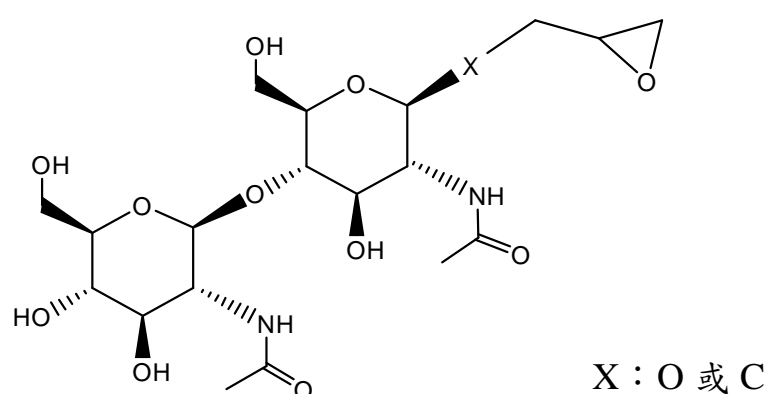


圖 3-14 β -幾丁雙糖的 epoxide 衍生物

3-3-3 ChiNCTU2 之催化作用的重要胺基酸

由於 NBACA 無法用以鑑定 ChiNCTU2 之重要胺基酸殘基，因此利用定點突變尋找此類胺基酸為唯一的選擇。首先，我們將數種 family 18 之幾丁質酵素進行胺基酸序列比對，其比對結果於附錄一，其中 ChiNCTU2 之 E145 與 Y213 與 *S. marcescens* ChiA 中之 E315 與 Y390 (已被鑑定為重要殘基) 均在相同保留位置。

我們以 Quik-change 之定點突變法將 E145 分別突變為 E145G、E145C 和 E145Q，而 Y213F 則突變成 Y213F，並分析其活性與 Michaelis 常數，整理比較於表 3-2。結果發現突變株 E145G、E145C、E145Q 的 K_m 有變小的趨勢，且 k_{cat} 值相較於野生株酵素，突變株 E145G 下降 3900 倍，E145C 下降 9100 倍，E145Q 下降 4800 倍， k_{cat}/K_m 值比較，則分別下降 2900 倍，5300 倍和 3100 倍。因此 E145 證實為 ChiNCTU2 的反應重要胺基酸，此與所有已知 family 18 幾丁質酵素相吻合。

然而，令人意外的是，突變株 Y213F 的 k_{cat} 、 K_m 與 k_{cat}/K_m 之值與野生株相近，並未造成酵素活性的喪失，Y213F 未如預期是 ChiNCTU2 水解反應的重要基團之一。我們推測 ChiNCTU2 (subfamily B) 與 *S. marcescens* (subfamily A) 和其他幾丁質酵素可能有不同的結構與催化反應機制。此論點亦可由胺基酸比對之結果得到佐證，在 *S. marcescens* ChiA 中，與 -1 和 +1 位置醣殘基結合區之胺基酸大都並未存在 ChiNCTU2 之比對保留區中 (請參閱緒論 1-3 胺基酸比對)。

表 3-2 野生株 ChiNCTU2 與突變株的活性比較

條件：50 mM pH 6.0 之 MES 緩衝液，觀測波長 348 nm

	$K_m(\text{mM})$	k_{cat}	relative k_{cat}	k_{cat}/K_m	relative k_{cat}/K_m
WILD TYPE	0.27	66.0	1	244.4	1
E145G	0.20	0.017	0.00026	0.085	0.00035
E145C	0.15	0.0071	0.00011	0.047	0.00019
E145Q	0.18	0.014	0.00021	0.078	0.00032
Y213F	0.61	123.4	1.87	202.3	0.83

$$k_{\text{cat}}/K_m : \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$$

3-3-4 反應中間體之探討

如果可以直接觀測到反應中間體，對於反應機制幾乎一目了然，而 ChiNCTU2 水解反應的中間體到底是形成共價性中間體，還是 *N*-acetyl group 參與反應的 anchimeric assistance？

為了解開疑惑，我們期望由突變株 E145G 的水解反應中可以看到中間體的累積，於是將突變株 E145G 與 2,4-DNPCB 作用。由 time course 反應圖 (圖 3-15)，可發現其為一雙相之動力反應現象 (biphasic kinetic)，此種反應現象顯示有中間體累積於反應中，可能為 glycosyl-enzyme 中間體或 oxazoline 中間體，而酵素與受質作用呈現兩種不同的反應速率，第一相之快速反應 (前 150 秒左右) 應為形成中間體的速率，第二相的低反應速率步驟應為中間體水解速率，此結果與 Brønsted plot 一致，即中間體之水解步驟為速率決定步驟。

為分析中間體，我們嘗試以 LC/MS 分析可能累積之 oxazoline 小分子或 glycosyl-enzyme 中間體，結果發現突變株 E145G 未被反應中間體標識，所以水解反應沒有共價性中間體的生成，因此反應可能形

成一般推測的 oxazoline 中間體，質譜分析亦在溶液中觀測到分子量 407 Da (H^+)與 429 Da (Na^+) 訊號的小分子，與 oxazoline 分子量大小相符。但此訊號也可能是產物幾丁雙糖脫水的質譜峰。為進一步釐清中間體是否為 oxazoline ring，我們已著手合成一含 thioacetyl group 的反應受質，如圖 3-16 所示，此受質應可形成共穩定的 thioazoline ring 中間體 (圖 3-17)。

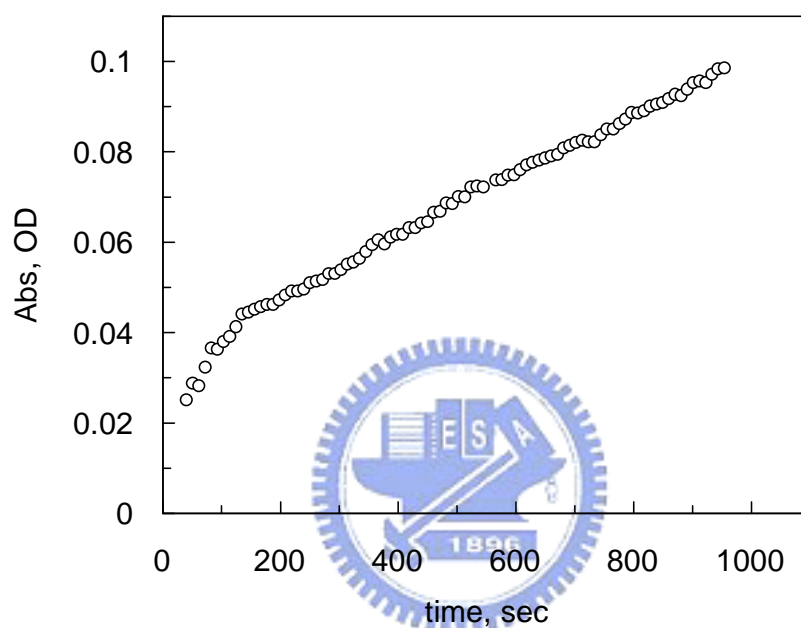


圖 3-15 E145G 與 2,4-DNPCB 反應 time course
(觀測波長 400 nm)

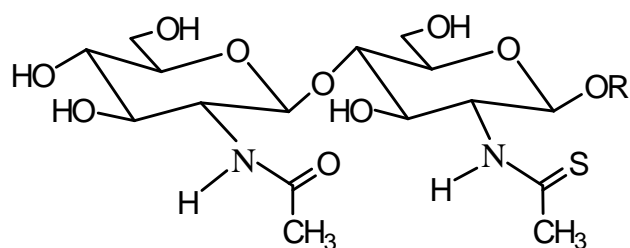


圖 3-16 (*N*- thioacetyl-D-glucosamine)₂ derivatives

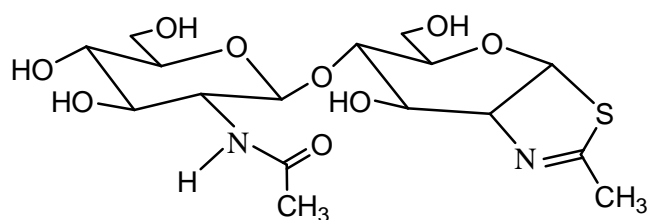


圖 3-17 (GlcNAc)₂-thiazoline

3-3-5 Sodium azide activation

因為中間體之水解為速率決定步驟，因此增加除了水以外的親核劑，如 N_3^- ，則可增強中間體水解速率。當 2,4-DNPCB 與 E145G 作用在 Sodium azide 濃度為 1.5 M 時，反應速率增加了 10~20%，當 azide 濃度達 2.5 M，活性增強將近 100% (圖 3-18)。此顯示中間體消失效率速率與親核劑存在有關，我們推論此與 ChiNCTU2 緊密結合之中間體可能是 oxazoline ring，當 E145 不存在時，水分子不易被極化而使催化水解中間體變慢，造成累積，此論亦可由 E145 各突變點酵素 K_m 值下降得到佐證。

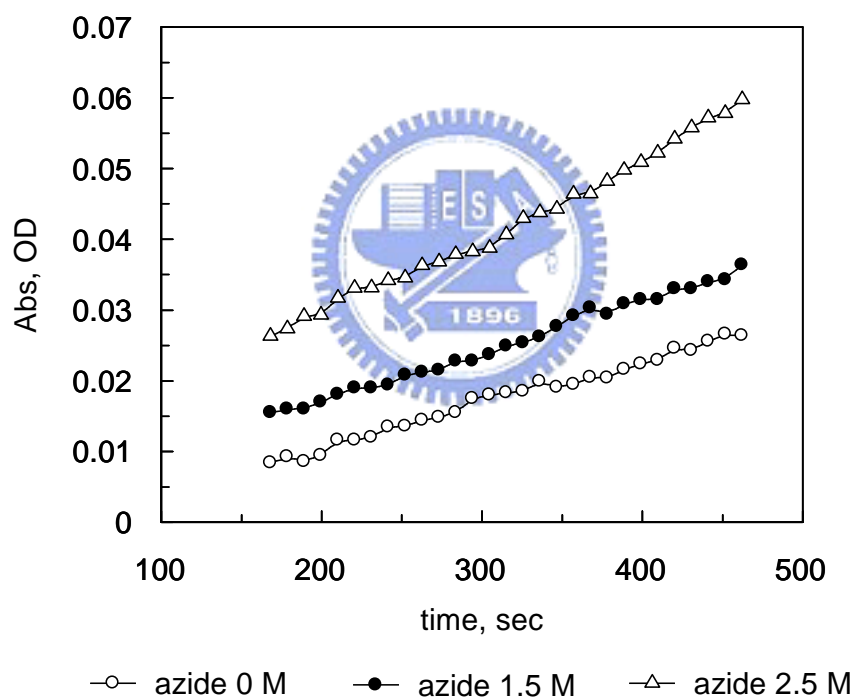


圖 3-18 Sodium azide activation 現象

3-4 本研究之未來工作

本實驗室目前正進行 $(N\text{-thioacetyl-D-glucosamine})_2$ derivatives 的合成，若水解反應機制是 anchimeric assistance，則當其與 ChiNCTU2 作用時會生成較穩定而不易水解的 thiazoline ring，可以藉由質譜儀等

方法觀察，此 thiazoline ring 的形成將會是證實 anchimeric assistance 機制最直接的證據。

另外，目前本實驗室也和同步輻射合作試圖將 ChiNCTU2 結晶，晶體的結構解析也將協助反應機制的推測。



第四章 結論

針對本研究主題 *Bacillus cereus* NCTU2 的幾丁質酵素的表現、純化與反應機制進行研究，其結果整理如下：

1. 含訊息胜肽之全長 ChiNCTU2 基因被建構於表現載體 pET-22b(+), 經轉型至大腸桿菌 BL21 (DE3) 後，有大量的幾丁質酵素表現，其訊息胜肽可被大腸桿菌 BL21 (DE3) 辨識而切除，這是 *Bacillus cereus* 幾丁質酵素在大腸桿菌系統第一個成功表現的例子。
2. 轉型後的大腸桿菌 BL21 (DE3) 產生之胞內酵素利用疏水性層析管柱 HIC 純化，可以獲得 90% 以上均質度之 ChiNCTU2。
3. 重組 ChiNCTU2 穩定性高，反應最佳活性在 pH 約 5.5 左右，在 pH 6.0 MES 緩衝液條件下，對 PNPCB 的反應活性之 K_m 為 0.27 mM， k_{cat} 為 66.0 s^{-1} 。
4. ChiNCTU2 是兩步置換水解機制，由 Brønsted plot 確定反應中間體的分解步驟 (breakdown) 是反應速率決定步驟，在突變株酵素 E145G 與 2,4-DNPCB 受質反應過程看到的雙相之動力反應現象 (biphasic kinetic)，發現中間體的累積。而 2.5 M 的 Sodium azide 可增強突變株酵素 E145G 對 2,4-DNPCB 受質的反應速率近 100%，顯示反應機制可能為 anchimeric assistance，反應中間體為 oxazoline ring。
5. 高濃度 N- bromoacetyl chitobiosyl amine (25 mM) 無法對 ChiNCTU2 進行活性位置標識找出催化反應的重要胺基酸，但卻是 ChiNCTU2 的可逆抑制劑，其 K_i 值為 0.64 mM。
6. 將 multialignment 推測的 essential group E145 突變成 E145Q、E145C 與 E145G，由活性測試結果顯示，突變株 ChiNCTU2 的 k_{cat} 值較野

生株下降 3900 ~ 9100 倍， $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ 下降 2900 ~ 5300 倍，因此可確定 ChiNCTU2 水解反應的 essential group 為 E145。

7. 在 *S. marcescens* 與其他幾丁質酵素高度保留的 Y213 經突變株 Y213F 的活性測試，結果 k_{cat} 、 K_{m} 與 $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ 之值與野生株相近。顯示 Y213 並未如預期是 ChiNCTU2 調控催化反應之重要胺基酸，因此我們推斷 ChiNCTU2 與 *S. marcescens* ChiA 之結構與催化機制可能不同。



第五章 参考文献

1. Aronson, N. N., Blanchard, C. J. and Madura, J. D. (1997) Homology modeling of glycosyl hydrolase family 18 enzymes and proteins. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **37**, 999-1005
2. Mabuchi, N. and Araki, Y. (2001) Cloning and sequencing of two genes encoding chitinases A and B from *Bacillus cereus* CH. *Can. J. Microbiol.* **47**, 895-902
3. Shu-yi Wang, Shaw-jye Wu, Thottappilly, G., Locy, R. D. and Singh, N. K. (2001) Molecular cloning and structural analysis of the gene encoding *Bacillus cereus* exochitinase Chi36. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **92**, 59-66
4. Vaaje-Kolstad, G., Vasella, A., Peter, M. G., Netter, C., Houston, D. R., Westereng, B., Synstad, B., Eijsink, V. G. H. and Van Aalten, D. M. F. (2004) Interactions of a family 18 chitinase with the designed inhibitor HM508 and its degradation product, chitobiono- δ -lactone. *The Journal of Biological Chemistry* **279**, 3612-3619
5. Merzendorfer, H. and Zimoch, L. (2003) -Review- Chitin metabolism insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinase. *The Journal of Experimental Biology* **206**, 4393-4412
6. Ikegami, T., Okada, T., Hashimoto, M., Seino, S., Watanabe, T. and Shirakawa, M. (2000) Solution structure of the chitin-binding domain of *Bacillus circulans* WL-12 chitinase A1. *The Journal of Biological Chemistry* **275**, 13654-13661

7. Wiwat, C., Siwayaprahm, P. and Bhumiratana, A. (1999) Purification and characterization of chitinase from *Bacillus circulans* No.4.1. *Current Microbiology* **39**, 134-140
8. Papanikolau, Y., Prag, G., Tavlas, G., Vorgias, C. E., Oppenheim, A. B. and Petratos, K. (2001) High resolution structural analyses of mutant chitinase A complexes with substrates provide new insight into the mechanism of catalysis. *Biochemistry* **40**, 11338-11343
9. Brameld, K. A. and Goddard III, W. A. (1998) Substrate distortion to a boat conformation at subsite -1 is critical in the mechanism of family 18 chitinases. *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 3571-3580
10. Synstad, B., Gåseidnes, S., Van Aalten, D. M. F., Vriend, G., Nielsen, J. E. and Eijsink, V. G. H. (2004) Mutational and computational analysis of the role of conserved residues in the active site of a family 18 chitinase. *Eur. J. Biochem.* **271**, 253-262
11. 溫智民，仙人掌桿菌中幾丁質酵素的選殖與表現研究，國立交通大學應用化學研究所，2002
12. 吳岳進，基因改造黏質沙雷氏桿菌幾丁質酵素之特性，國立交通大學應用化學研究所，2002
13. Tews, I., Van Scheltinga, A. C. T., Perrakis, A., Wilson, K. S. and Dijkstra, B. W. (1997) Substrate-assisted catalysis unifies two families of chitinolytic enzymes. *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 7954-7959
14. Van Aalten, D. M. F., Komander, D., Synstad, B., Gåseidnes, S., Peter,

- M. G. and Eijsink, V. G. H. (2001) Structural insights into the catalytic mechanism of a family 18 exo-chitinase. *Biochemistry* **98**, 8979-8984.
15. Fukamizo, T. (2000) Chitinolytic enzyme: catalysis, substrate binding, and their application. *Curr Protein Pept Sci.* **1**, 105-24.
16. Yaw-Kuen Li, Jiunly Chir, Tanaka, S. and Fong-Yi Chen (2002) Identification of the general acid/base catalyst of a family 3 β -glucosidase from *Flavobacterium meningosepticum*. *Biochemistry* **41**, 2751-2759.
17. Van Scheltinga, A. C. T., Armand, S., Kalk, K. H., Isogai, A., Henrissat, B. and Dijkstra, B. W. (1995) Stereochemistry of chitin hydrolysis by a plant chitinase/lysozyme and X-ray structure of a complex with allosamidin: evidence for substrate assisted catalysis. *Biochemistry* **34**, 15619-15623.
18. Lai, E. C. K. and Withers, S. G. (1994) Stereochemistry and kinetics of the hydration of 2-acetamido-D-glucal by β -N-acetylhexosaminidases. *Biochemistry* **33**, 14743-14749
19. Kobayashi, S., Kiyosada, T. and Shin-ichiro Shoda (1996) Synthesis of artificial chitin: irreversible catalytic behavior of a glycosyl hydrolase through a transition state analogue substrate. *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 13113-13114
20. Fujita, M., Shin-ichiro Shoda, Haneda, K., Inazu, T., Takegawa, K. and Yamamoto, K. (2001) A novel disaccharide substrate having 1,2-oxazoline moiety for detection of transglycosylating activity of

- endoglycosidases. *Biochimica et Biophysica Acta* **1528**, 9-14
21. Knapp, S., Vocadlo, D., Gao, Z., Kirk, B., Lou, J. and Withers, S. G. (1996) NAG-thiazoline, an *N*-acetyl- β -hexosaminidase inhibitor that implicates acetamido participation. *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 6804-6805
22. Fukamizo, T., Sasaki, C., Schelp, E., Bortone, K. and Robertus, J. D. (2001) Kinetic properties of chitinase-1 from the fungal pathogen *Coccidioides immitis*. *Biochemistry* **40**, 2248-2454
23. Ibatullin, F. M., and Selivenov, S. I. (2002) Reaction of 1,2-*trans*-glycosyl acetates with phosphorus pentachloride: new efficient approach to 1,2-*trans*-glycosyl chlorides. *Tetrahedron letters* **43**, 9577-9780
24. Ghosh, A. K. and Farquhar, D. (1997) A methyl glucuronate prodrug of phosphorodiamidic mustard. *Tetrahedron letters* **38**, 8795-8798
25. Semenuk, T., Krist, P., Pavlicek, J., Bezouska, K., Kuzma, M., Novak, P. And Kren, V. (2001) Synthesis of chitooligomer-based glycoconjugates and their binding to the rat natural killer cell activation receptor NKR-P1. *Glycoconjugate Journal*, **18**, 817-826
26. Lindner, P., Blank, K., Diefenbach, B. and Pluckthun A. (2002) in UCHIS'02, 5th International Conference of the European Chitin Society : Chitin binding domains for immobilizing antibody fragments in immunaffinity chromatography. Vol. VI, 1 Ed., pp. 261-262, VI vols., NTNU Trondheim, Norway, Trondheim, Norway

27. Hollis, T., Honda, Y., Fukamizo, T., Marcotte, E., Day, P. J. and Robertus, J. D. (1997) Kinetics analysis of barley chitinase. Archives of Biochemistry and Biophysics **344**, 335-342
28. Houston, D. R., Shiomi, K., Arai, N., Omura, S., Peter, M. G., Turberg, A., Synstad, B., Eijsink, V. G. H. and Van Aalten, D. M. F. (2002) High-resolution structures of a chitinase complexed with natural product cyclopentapeptide inhibitors : mimicry of carbohydrate substrate. Biochemistry **99**, 9127-9132
29. Houston, D. R., Eggleston, I., Synstad, B., Eijsink, V. G. H. and Van Aalten, D. M. F. (2002) RESEARCH COMMUNICATION The cyclic dipeptide CI-4 [cyclo-(L-Arg-D-Pro)] inhibits family 18 chitinases by structural mimicry of a reaction intermediate. Biochem. J. **368**, 23-27
30. Bortone, K., Monzingo, A. F., Ernst, S. and Robertus, J. D. (2002) The structure of an allosamidin complex with the *Coccidioides immitis* chitinase defines a role for a second acid residue in substrate-assisted mechanism. J. Mol. Biol. **320**, 293-302
31. Mabuchi, N., Hashizume, I. and Araki, Y. (2000) Characterization of chitinases excreted by *Bacillus cereus* CH. Can. J. Microbiol. **46**, 370-375
32. Shi-Yi Wang, Anna-Laure Moyne, Thottappily, G., Shaw-Jye Wu, Locy, R. D. and Singh, N. K. (2001) Purification and characterization of a *Bacillus cereus* exochitinase. Enzyme and Microbial Technology **28**, 492-498

附錄一

S._marcescens	NADGCTASDATEI VVADTDGSHLAPLKEPLLEKNKPYKQNSG--KVVGSYFVEWGVYGRN
Enterobacter_sp	NADGCTASDATEI VVADTDGSHLAPLKEPLLEKNKPYKQNSG--KVVGSYFVEWGVYGRN
Arthrobacter_sp	TAVPTTPTAVPTATPTTPPPTTPAAGTPTSNDPEKCRPDGLYQTPGVNVPYCSVYDEA
NP_654321	KSKKFTLLLLSLLLFLPL---FLTNFITPNVVLADSQKQDQ---KIVG-YFPSWGIYGRN
AAT29480	KSKKFTLLLLSLLLFLPL---FLTNFITPNVVLADSQKQDQ---KIVG-YFPSWGIYGRN
B._cereus_Chi_cw	RSQKFTLLLLSLLLFLPL---FLTNFITPNLALADSPKQSQ---KIVG-YFPSWGVYGRN
B._circulans_WL12	NLNKHTAFKKTAKFFLGLS--LLLSVIVPSFALQPATAEAADSYPKIVG-YYPSWAAYGRN
B._cereus_Chi_36	MLNKFKFICCTLVIFLLLP-----LAPFQAQAANLGS----KLLVGYWHNFDNGTGI
B._cereus_NCTU2	MLNKFKFFCCILVMFLLLP-----LSPFQAQAANLGS----KLLVGYWHNFDNGTGI

S._marcescens	FTVDKI PAQNLTHLLYGFIPICGGNGINDSLKEIEGSFQALQRSCQGRE-----DF
Enterobacter_sp	FTVDKI PAQNLTHLLYGFIPICGGNGINDSLKEIEGSFQALQRSCQGRE-----DF
Arthrobacter_sp	GRELLPNGLEQRVIGYFTSWRTGE--NGAPRYLASDIPWKKLSHINYAFAHIDKNNKVS
NP_654321	YQVADIDASKLTHLNYAFADICWN-GKHGNPSTHPDNPKNQTNWCKESGVPLQNKEVPNG
AAT29480	YQVADIDASKLTHLNYAFADICWN-GKHGNPSTHPDNPKNQTNWCKESGVPLQNKEVPNG
B._cereus_Chi_cw	YQVADIDASKLTHLNYAFADICWN-GKHGNPSTHPDNPKNQTNWCKESGVPLQNKEVPNG
B._circulans_WL12	YNVADIDPTKVTHINNYAFADICWN-GIHGNP--DPSGPNPVTWTCQNEKS--QTINVPNG
B._cereus_Chi_36	IKLRDVSP-KWDVINVSFGETGGD-----R
B._cereus_NCTU2	IKLKDVSP-KWDVINVSFGETGGD-----R

362

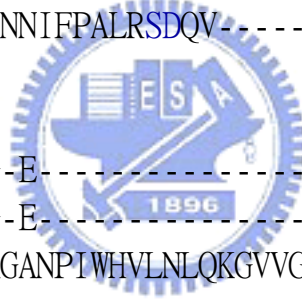
S._marcescens L-----GSPQDGETYVLLMKELRAMLDQLSTETGRKYE~~LTSA~~I SAGKDKIDKVAYNV
Enterobacter_sp L-----GSPQDGETYVLLMKELRAMLDQLSAETGRKYE~~LTSA~~I SAGKDKIDKVAYNV
Arthrobacter_sp PDDFAI SEPRRAVL FENYMKLMKTLREKLDKASVADGTY~~YQLTVA~~APASGWLLRGMEAHO
NP_654321 S-----YRPEDKQNFTLLQDVRNALTKAGAEDGKQYLL~~TI~~ASGASQRYADHTELKK
AAT29480 S-----YRPEDKQNFTLLQDVRNALTKAGAEDGKQYLL~~TI~~ASGASQRYADHTELKK
B._cereus_Chi_cw S-----YRPEDKQNFTLLQDVRNALNKAGAEDGKQYLL~~TI~~ASGASQRYADHTELKK
B._circulans_WL12 S-----KRPEDKQNYTLLLSKIREKLDAA~~GA~~VDGK~~KYLLTI~~ASGASATYAANTELAK
B._cereus_Chi_36 N-----FKNPTTPQIVNLI~~SAIRTI~~SDHYGP----D~~FLLS~~MAP---ETAYVQGGYSA
B._cereus_NCTU2 N-----FKNPTTPQIVNLI~~SAIRTI~~SDHYGP----D~~FLLS~~MAP---ETAYVQGGYSA

388 390 391

S._marcescens AQNSMDHIFLMSYDFYGA~~FDL~~KNLGHQ~~TAL~~NAPAWKPD~~TA~~-----YTTVNGVNA
Enterobacter_sp AQNSMDHIFLMSYDFYGA~~FDL~~KNLGHQ~~TAL~~NAPAWKPD~~TA~~-----YTTVNGVNA
Arthrobacter_sp VVKYLD~~FVN~~MMSYDLHGAWNNFVGCN~~PAL~~FDDGK~~DPELA~~AAGGVYNAYKGI~~GYL~~NSDWAYH
NP_654321 ISQILDWINIMTYDFHGGWEATSTH~~NAALY~~KDPNDPAAD~~T~~-----KFYVDGAI~~DI~~
AAT29480 ISQILDWINIMTYDFHGGWEATSNH~~NAALY~~KDPNDPAAD~~T~~-----KFYVDGAI~~DI~~
B._cereus_Chi_cw ISQILDWINIMTYDFHGGWEATSNH~~NAALY~~KDPNDPAAN~~T~~-----NFYVDGAI~~NV~~
B._circulans_WL12 IAAIVDWINIMTYDFNGAWQKI~~SAHN~~APLN~~YDPA~~ASAAGVP-----DANTFNVAAGA~~QG~~
B._cereus_Chi_36 YRSIWGAYLP~~II~~YGVKDKLTYIHVQH~~YNAG~~SGIGMDGN~~NY~~-----NQGT
B._cereus_NCTU2 YGSIWGAYLP~~II~~YGVKDKLTYIHVQH~~YNAG~~SGIGMDGN~~ND~~-----NQGT

444 446

S._marcescens	LLAQGVKPGKIVVGTAMYGRGWTGVNGYQNNIP-----FTGTATG-----PVKGTWEN
Enterobacter_sp	LLAQGVKPGKIVVGTAMYGRGWTGVNGYQNNIP-----FTGTATG-----PVKGTWEN
Arthrobacter_sp	YFRGAMPAGRINLGVPFYTRGWTNVQGGTNGLYGSSVLADQNKCAPGTGPKAGGNSKCGD
NP_654321	YTNEGVPADKLVLGVPFYGRGWKSCG-KENNGQ-----YQPCKPGSDGKLASKGTWDD
AAT29480	YTNEGVPADKLVLGVPFYGRGWKSCG-KENNGQ-----YQPCKPGSDGKLASKGTWDD
B._cereus_Chi_cw	YTNEGVPVDKLVLGVPFYGRGWKSCG-KENNGQ-----YQPCKPGSDGKLASKGTWDD
B._circulans_WL12	HLDAGVPAAKLVLGVPFYGRGWDGCA-QAGNGQ-----YQTCTGGS-----SVGTWEA
B._cereus_Chi_36	ADYEVAMADMLLHGFPVGGNANNMFPALRSDQV-----MIGLP-----
B._cereus_NCTU2	ADYEVAMADMLLHGFPVGGNANNIFPALRSDQV-----MIGLP-----



S._marcescens	G-----IVDYRQIAGQFMSG-E-----WQYTYD
Enterobacter_sp	G-----IVDYRQIASQFMSG-E-----WQYTYD
Arthrobacter_sp	GAGGIDNLWHDSDPMGGELAAGANPIWHVLNLQKGVVDYAASYGSPTGALKGTYTRHFD
NP_654321	YSTGDTGVYDYGDLAANYVNKNG-----FVRGWN
AAT29480	YSTGDTGVYDYGDLAANYVNKNG-----FVRGWN
B._cereus_Chi_cw	YSTGDTGVYDYGDLAANYVNKNG-----FVRYWN
B._circulans_WL12	GS-----FDYDLEANYINKNG-----YTRYWN
B._cereus_Chi_36	-----ATPAAAPSGG-----YISPTE
B._cereus_NCTU2	-----AAPAAAPSGG-----YISPTE

S._marcescens ATAEAPYVFKPSTGDLITFDDARSVQAKGKYVLDKQLGGLFSWEIDADNG-----
Enterobacter_sp ATAEAPYVFKPSTGDLITFDDARSVQAKGKYVLDKQLGGLFSWEIDADNG-----
Arthrobacter_sp NVTKNEWVNDTTKTFLSGDADQAIQAKADYVADKGLGGVMIWELAGDYEYNASKG----
 NP_654321 DVAKVPYLYNATTGTFISYDDNESMKYKTDYIKTKGLSGAMFWELSGDCRTSPKYSCSGP
 AAT29480 DVAKVPYLYNATTGTFISYDDNESMKYKTDYIKTKGLSGAMFWELSGDCRTSPKYSCSGP
B._cereus_Chi_cw DTAKVPYLYNATTGTFISYDDNESMKYKTDYIKTKGLSGAMFWELSGDCRTSPKYSCSGP
B._circulans_WL12 DTAKVPYLYNASNKRFISYDDAESVGYKTAYIKSKGLGGAMFWELSGDRNKTLQN-----
B._cereus_Chi_36 MKKALDYIKG-----IPFGGKYKLSNESGYP---AFRGLMSWSINWDAKNN-----
B._cereus_NCTU2 MKKALNYIKG-----VPFGGKYKLSNQGSGYP---AFRGLMSWSINWDAKNN-----



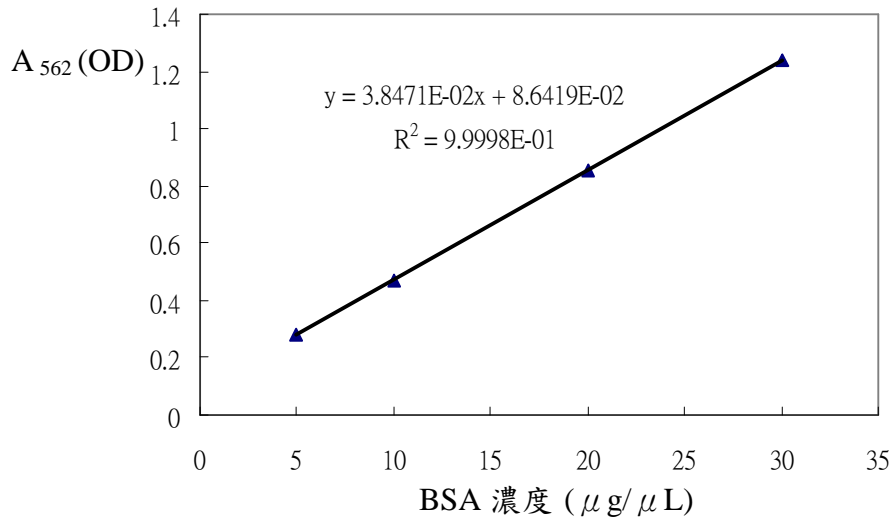
(bind with +1 sugar ring: W275, E315, F316, M388, D391, R446)

(bind with -1 sugar ring: Y163, W275, D313, E315, A362, M388, Y390, D391, Y444, R446, W539)

附錄三

一. 蛋白質濃度測定 (以標準品 BSA 建立蛋白質檢量線)

$$A_{562}(\text{OD}) = 3.8471 \times 10^{-2} \times [\text{BSA 濃度}] + 8.6419 \times 10^{-2}$$



二. 野生株與突變株酵素濃度測定

野生株幾丁質酵素 $1 \mu\text{L} \sim 0.5775 \mu\text{g}$, 約 $15.94 \mu\text{M}$ 。

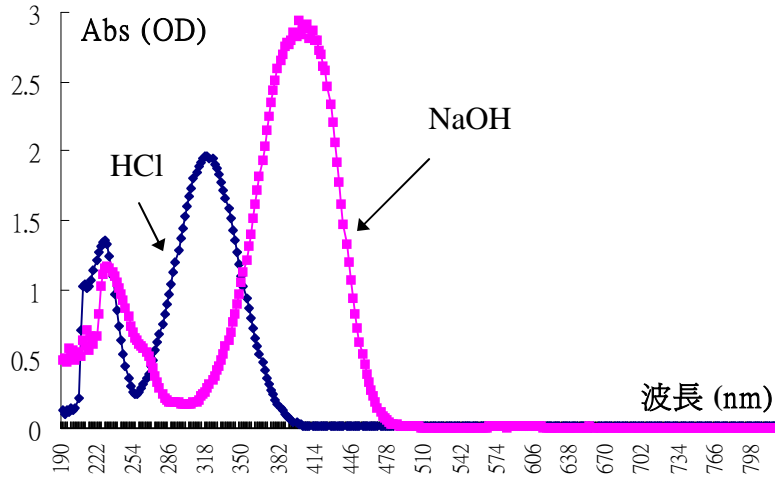
	Wild type	E145Q	E145C	E145G	Y213F
$A_{280}(\text{OD})$	0.803	1.74	4.24	1.55	1.175
濃度 ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	0.5775	1.249	3.053	1.116	0.8454

$$E^{1\%}(\text{wild type}) = 1 \text{ g Enzyme}/100 \text{ g Solvent}$$

$$= (1/0.5775) \times 0.803 = 13.90 \text{ OD}$$

附錄四

等吸收點測定 (由 PNP 在強酸、強鹼下求等吸收點)



將 1 mM 的 PNP 分別在強鹼 (NaOH) 與強酸 (HCl) 測得的 $u \nu$ 吸收光譜疊圖，兩曲線交於約波長 348 nm，以等吸收點波長 348 nm 算出吸收係數 ϵ 約 $5686.03 \text{ (cm} \times \text{M)}^{-1}$ 。

附錄五 ChiNCTU2 基因序列 (含 Signal peptide)

9 18 27 36 45 54
 5' ATG TTA AAC AAG TTC AAA TTT TTT TGT TGT ATT TTA GTA ATG TTC TTA CTT CTA

 Met Leu Asn Lys Phe Lys Phe Phe Cys Cys Ile Leu Val Met Phe Leu Leu Leu

 63 72 81 90 99 108
 CCG CTA TCC CCT TTC CAA GCA CAA GCA GCA AAC AAT TTA GGT TCA AAA TTA CTC

 Pro Leu Ser Pro Phe Gln Ala Gln Ala Ala Asn Asn Leu Gly Ser Lys Leu Leu

 117 126 135 144 153 162
 GTT GGA TAT TGG CAT AAC TTT GAT AAC GGT ACT GGC ATT ATT AAA TTA AAA GAC

 Val Gly Tyr Trp His Asn Phe Asp Asn Gly Thr Gly Ile Ile Lys Leu Lys Asp

 171 180 189 198 207 216
 GTT TCA CCA AAA TGG GAT GTA ATC AAT GTA TCT TTT GGT GAA ACT GGT GGT GAT

 Val Ser Pro Lys Trp Asp Val Ile Asn Val Ser Phe Gly Glu Thr Gly Gly Asp

 225 234 243 252 261 270
 CGT TCC ACT GTT GAA TTT TCT CCT GTG TAT GGT ACA GAT GCA GAC TTC AAA TCA

 Arg Ser Thr Val Glu Phe Ser Pro Val Tyr Gly Thr Asp Ala Asp Phe Lys Ser

 279 288 297 306 315 324
 GAT ATT TCT TAT TTA AAA AGT AAA GGA AAG AAA GTA GTT CTT TCA ATA GGT GGA

 Asp Ile Ser Tyr Leu Lys Ser Lys Gly Lys Lys Val Val Leu Ser Ile Gly Gly

 333 342 351 360 369 378
 CAA AAT GGA GTC GTT TTA CTT CCT GAC AAT GCC GCT AAG GAT CGT TTT ATT AAT

 Gln Asn Gly Val Val Leu Leu Pro Asp Asn Ala Ala Lys Asp Arg Phe Ile Asn

387 396 405 414 423 432
 TCC ATA CAG TCT CTA ATC GAT AAA TAC GGT TTT GAT GGA ATA GAT ATT GAC CTT
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
 Ser Ile Gln Ser Leu Ile Asp Lys Tyr Gly Phe Asp Gly Ile Asp Ile Asp Leu

 441 450 459 468 477 486
 GAA TCA GGT ATT TAC TTA AAC GGA AAT GAT ACT AAT TTC AAA AAT CCA ACT ACT
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
 Glu Ser Gly Ile Tyr Leu Asn Gly Asn Asp Thr Asn Phe Lys Asn Pro Thr Thr

 495 504 513 522 531 540
 CCC CAA ATC GTA AAT CTT ATA TCA GCT ATT CGA ACA ATC TCA GAT CAT TAT GGT
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
 Pro Gln Ile Val Asn Leu Ile Ser Ala Ile Arg Thr Ile Ser Asp His Tyr Gly

 549 558 567 576 585 594
 CCA GAT TTT CTA TTA AGC ATG GCT CCT GAA ACA GCT TAT GTT CAA GGC GGT TAT
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
 Pro Asp Phe Leu Leu Ser Met Ala Pro Glu Thr Ala Tyr Val Gln Gly Gly Tyr

 603 612 621 630 639 648
 AGC GCA TAC GGA AGC ATC TGG GGT GCA TAT TTA CCA ATT ATT TAC GGA GTG AAA
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
 Ser Ala Tyr Gly Ser Ile Trp Gly Ala Tyr Leu Pro Ile Ile Tyr Gly Val Lys

 657 666 675 684 693 702
 GAT AAA CTA ACA TAC ATT CAT GTT CAA CAC TAC AAC GCT GGT AGC GGG ATT GGA
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
 Asp Lys Leu Thr Tyr Ile His Val Gln His Tyr Asn Ala Gly Ser Gly Ile Gly

 711 720 729 738 747 756
 ATG GAC GGT AAT AAC TAC AAT CAA GGT ACT GCA GAC TAC GAG GTC GCT ATG GCA
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
 Met Asp Gly Asn Asn Tyr Asn Gln Gly Thr Ala Asp Tyr Glu Val Ala Met Ala

 765 774 783 792 801 810
 GAT ATG CTC TTA CAT GGT TTT CCT GTA GGT GGT AAT GCA AAT AAC ATT TTC CCA
 --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
 Asp Met Leu Leu His Gly Phe Pro Val Gly Gly Asn Ala Asn Asn Ile Phe Pro



819 828 837 846 855 864
GCT CTT CGT TCA GAT CAA GTC ATG ATT GGG CTT CCA GCA GCA CCA GCG GCA GCT

Ala Leu Arg Ser Asp Gln Val Met Ile Gly Leu Pro Ala Ala Pro Ala Ala Ala

873 882 891 900 909 918
CCA AGT GGT GGA TAC ATT TCG CCA ACT GAA ATG AAA AAA GCT TTA AAT TAT ATC

Pro Ser Gly Gly Tyr Ile Ser Pro Thr Glu Met Lys Lys Ala Leu Asn Tyr Ile

927 936 945 954 963 972
ATT AAA GGA GTT CCG TTC GGA GGA AAG TAT AAA CTT TCT AAC CAG AGT GGC TAT

Ile Lys Gly Val Pro Phe Gly Gly Lys Tyr Lys Leu Ser Asn Gln Ser Gly Tyr

981 990 999 1008 1017 1026
CCT GCA TTC CGC GGC CTA ATG TCT TGG TCT ATT AAT TGG GAT GCA AAA AAC AAC

Pro Ala Phe Arg Gly Leu Met Ser Trp Ser Ile Asn Trp Asp Ala Lys Asn Asn

1035 1044 1053 1062 1071 1080
TTC GAA TTC TCA AAT AAC TAT AGA ACA TAT TTT GAT GGT CTT TCC TTG CAA AAA

Phe Glu Phe Ser Asn Asn Tyr Arg Thr Tyr Phe Asp Gly Leu Ser Leu Gln Lys

TAA 3'
