

國立交通大學

應用化學研究所

博士論文

National Chiao Tung University

Department of Applied Chemistry

Ph.D Thesis

醣苷水解酵素家族 29 與 64 的反應機制與重要催化殘
基之鑑定

Catalytic mechanistic and identification of essential residues of
Glycohydrolase in family GH-29 and GH-64

研究生：柳勝文 (Sheng-Wen Liu)

指導教授：李耀坤 博士 (Dr. Yaw-Kuen Li)

中華民國九十八年六月

謝 誌

每個人的一生就像一道道燦爛光束般，雖然顏色、能量、強度都不盡相同，但當這些光束彼此交會時，卻會依兩人的緣份綻放最繽紛的花火。雖然人與人的際遇就像網狀結構般的雜亂無章。但，我卻在這六~七年中，與一群不相識的研究生，在交通大學應用化學所李耀坤老師所領導的實驗室中，交織出一道道最美妙的時光與難抹滅的回憶。

衷心感謝指導教授 李耀坤老師在這七年多來研究生涯上的指導，讓我在遇到實驗的瓶頸時能夠迎刃而解；亦感謝老師平常的關懷與鼓勵，讓我更有精神面對挑戰。

另外，從資格考開始到非論文考試，一直到最後的學位考試，一路幫我度過的幾位老師包括：林俊宏老師、王雯靜老師、吳東昆老師、蒙國光老師、林立元老師。感謝你們對我在整體實驗邏輯上的慎密性，總不吝地給予最中肯的辨證。相當用心地加以輔正並給予論文上具體的指導和建議，使本論文更臻完美。而老師們在學理上的雄厚底子，也是學生學習與效法的對象。

首先，特別感謝清大張承文博士在蛋白質結構模擬，銘聰和信茂學弟在蛋白質晶體結構上的幫忙，朝勝與世聖學弟在實驗上的大力支持，以及分別在質譜和 NMR 儀器上幫忙的李小姐和張小姐。感謝這七年博士班一直相挺幫忙的難兄難弟岳進、可欣。另外，也感謝阿尼、家瑜、慧貞、晟富、佩君、蟬依、KK。還有暉婷、阿烈、育嫻學妹、模沅、丞偉學弟，因為你們在實驗上的協助讓我的研究生活永遠充滿歡樂。

最後我要感謝我的家人，爸媽、弟以及兩個妹妹的關心以及支持；你們總是毫不保留的替我加油打氣，有你們的支持我才能挫折中再度站起來，我愛你們！僅以此獻給我親愛的家人們，往後會更加努力，回報你們對我的付出與其許。

在交大七年多的光陰要感謝的人實在太多了，深怕不慎有所遺漏。若有為之，真是甚感抱歉！感謝賜給我這一切的人，並感謝關心我、陪伴著我的人，僅能以小小的版面了表我最深的謝意。未來我會更加努力，也在此給與你們最大的祝福

願大家都能平安、順心、健康、愉悅！

勝文

2009/6/16

序言

複雜性糖苷化合物包含著糖苷分子與蛋白質或油脂以化學鍵結合而成的複合物或多醣類，其功能與生命現象有著密切的關係。這些複雜醣類化合物的生物學研究稱之為 glycobiology，包括有醣共軛 [glycoconjugates，指醣蛋白(glycoproteins)、醣脂(glycosphingolipids)和蛋白多醣(proteoglycans)的合稱]、微生物的莢膜多糖類和酯多醣(lipopolysaccharides)…等多方面研究。這些複雜性糖苷化合物在生物體是重要的訊息分子，亦蘊含抗原決定因子和生物活性區域的化學構造及結合性質，參與許多生理和病理過程，包括參與生物體受精、發育、分化、免疫、神經系統的識別與調控；在微生物與動物、植物的相互作用中擔負重要作用；在衰老、癌症過程中也涉及到醣類物質的參與。因此，藉由瞭解醣苷分子在生物學和醫學上扮演的角色研究，可進而在疫苗製造、血清診斷的改進，更加速癌症、病毒/菌感染、各類遺傳疾病…等治療。

酶，又稱為酵素，具有催化功能的蛋白質，在生物體中是具有催化新陳代謝及生合成(biosynthesis)反應的蛋白分子；於生物體藉著各種酵素的催化反應與調節，才能有效地完成所需要的生理活動。這些功能性的蛋白質，大致可區分為氧化還原、轉移、水解、裂解、異構和鍵結等六大類酶。醣苷水解酵素(Glycoside hydrolases)，是其中一種專門催化糖苷鍵(Glycosidic bond)的水解型酵素，為自然界中常見的酵素之一，生物體中此類酵素通常扮演代謝與調節的重要角色。相同的醣苷水解酵素存在於人體的不同區域，甚至同一細胞的不同胞器(Organelle)內，會有不同的角色與功能扮演；另外，亦有不同的醣苷水解酵素，即使彼此角色功能不同，但所辨視的受質(Substrate)卻相近。因糖苷分子的多重種類(D-、L-form 和五、六圓環…等)和糖苷複合體鍵結位向的多樣性結構，趨使在自然界生物體中醣苷水解酵素亦不斷演化出各不同作用、結構型態酵素。根據酵素結構與水解功能的關係，可將醣苷水解酵素的催化

反應途徑區分為構形保留 (retention configuration) 及構形反轉 (invertin configuration) 兩種模式。因此，當生物細胞內的酵素活動受到抑制或干擾，將趨使生物體產生反應異狀或死亡，造就酵素往往成為開發藥物的重要目標。

在這些複合體結構中，具有岩藻糖修飾的醣類分子具有各種不同的生理活性，例如人體中 A, B, H, 及 Lewis 抗原的非還原端常常含有岩藻糖修飾，而這些抗原則是血型分類的重要辨識指標。除此之外，L-岩藻糖還涉及植物本身的防禦、人體發炎反應、細胞凋亡 (Apoptosis)、癌症腫瘤的轉移以及人類基因遺傳疾病 Fucosidosis。另一長鏈聚醣的 β -1,3/6-葡聚糖為一種生物體免疫調節劑，對人體免疫產生刺激作用，增加巨噬細胞的分裂、吞噬作用，並分泌多種細胞激素。

所以，在本論文中，我們將分為兩部分，對催化此兩不同糖苷受質的醣苷水解酵素，分別為 α -L-岩藻糖水解醣苷酵素 (α -L-Fucosidase, EC 3.2.1.51) 和 β -1,3-葡聚五糖生產水解醣苷酵素 (Laminaripentaose-producing β -1,3-glucanase, EC 3.2.1.39) 作為研究探討主體。針對上述兩種不同醣苷酵素催化水解機制進行研究，瞭解酵素在催化水解中可能的作用反應和過渡狀態 (Transition state)，進一步鑑定酵素催化之重要殘基；同時，亦解開酵素的蛋白質 3D 晶體結構，作為日後新藥開發與生理活性…等相關研究之基礎。

醣苷水解酵素家族 29 與 64 的反應機制與重要催化 殘基之鑑定

學生：柳勝文

指導教授：李耀坤 教授

國立交通大學應用化學所博士班

第一部分：家族 29 之人類 α -L-岩藻糖水解醣苷酵素的蛋白質表
現、突變以及催化反應機制和重要殘基的研究與探討



人類 α -L-岩藻糖水解醣苷酵素(Human α -L-fucosidase, *h*-Fuc)屬於醣苷類水解
酵素第29家族的水解酵素(EC 3.2.1.51)，本研究著重於該酵素的相關催化功能、反應
機構與催化重要殘基之鑑定探討。

本研究成功地將人類肝細胞組織 α -L-岩藻糖水解醣苷酵素表現於大腸桿菌
系統中。首先，將人類肝細胞組織 α -L-岩藻糖水解醣苷酵素之 基因，重組建構在
pET22b(+)表現質體上，後轉殖進入大腸桿菌 BL21(DE3)系統中表現，於 pH 值 6.0 的
LBA 液體培養基中，並以 IPTG 誘導培養；後經由離子交換管柱(SP、Q)及 G-75 凝膠
管柱等層析管柱純化處理，可以取得均質度達 95%的重組酵素，酵素單體的分子量
約為 50 kDa 左右。以 p-nitrophenyl- α -L-fucopyranoside (pNPF)為反應受質進行對重組

h-Fuc 酵素之催化活性分析。實驗結果顯示重組 *h*-Fuc 酵素在 pH 5.0 的環境下，求得其 K_m 以及 k_{cat} 分別為 0.105 mM 和 48.6 s^{-1} ，相較於文獻中自人類肝臟萃取純化之原生 *h*-Fuc 酵素 ($K_m = 0.43 \text{ mM}$, $k_{cat} = 16.3 \text{ sec}^{-1}$)，重組之 *h*-Fuc 酵素的催化能力 (k_{cat}/K_m) 約為肝臟原生酵素的 12 倍。同時，亦得知在溶液 pH 4.5 以及 pH 6.5 左右存在有兩活性最佳區域，而當溶液 pH 值小於 3.0 或是大於 7.5 後，酵素即會呈現不穩定狀態，使催化活性下降。利用 $^1\text{H-NMR}$ 光譜分別觀測 *h*-Fuc 酵素催化水解受質 pNPF 的立體選擇性，與在含有特定比例甲醇/水之溶液中，進行 *h*-Fuc 酵素的轉糖反應，發現在以不同芳香族離去基之糖苷 受質與 *h*-Fuc 酵素作用反應下，催化過程皆經由一 fucosyl-enzyme 中間體的形成，得知其 *h*-Fuc 酵素催化反應為一似 S_N1 的雙步驟取代之保留構型機制。並利用化學合成法合成一系列具有不同芳香族離去基之糖苷受質進行 Brønsted relationship 之研究，得到 Brønsted constant ($\log k_{cat}$ 之 β_{lg} 值為 -0.13 與 $\log k_{cat}/K_m$ 之 β_{lg} 值為 -0.27)，推測酵素催化速率決定步驟應為糖基化(fucosylation)步驟。隨後我們藉由已知的 Tm-Fuc 酵素晶體結構，進行 *h*-Fuc 酵素的蛋白結構與胺基酸二級結構序列之模擬分析，選擇以位於 β -平板結構上的八個高保留殘基，進行酵素之定點突變，觀測各突變株酵素與受質 pNPF 的動力學反應速率分析。發現有兩胺基酸 D225G 和 E289G 之突變株酵素在反應速率 k_{cat}/K_m 值，分別降為野生株的 20,000 和 450 倍以上。接著在不同 pH 值緩衝溶液下，以此兩定點突變株酵素進行 pH-profile 曲線的反應活性表現，結果顯示出兩胺基酸的突變株酵素與野生株有著很大差異。並利用加入親核性陰離子試劑對兩突變株 D225G 和 E289G 酵素進行化學活性復活技術。當以外加疊氮陰離子分別對 D225G 和 E289G 兩突變株進行化學活性復活反應，發現催化反應速率 k_{cat} 值分別可增加約 6 和 24 倍，並於氫核磁共振磁譜分析出 β -fucosyl_azide 與 α -fucosyl_azide 的兩突變酵素作用產物。最後，以突變株 E289G 酵素與受質 pNPF 反應一段時間後，於液相質譜中偵測到岩藻糖-酵素之過渡狀態中間體的累積產物分子量。這些實驗結果指出 *h*-Fuc 酵素催化反應中扮演親核基和一般酸鹼基分別為 Asp²²⁵ 和 Glu²⁸⁹。這是首次完成人類 α -L-岩藻糖苷水解酵素之反應機構與重要催化殘基鑑定的研究。

第二部分：家族 64 的鏈黴菌 DIC-108 之 β -1,3-葡聚五糖生產水解糖苷酵素的人造基因選殖、蛋白質表現與突變以及蛋白質結構和重要殘基的研究與探討

摘要

本研究旨在探討自 *Streptomyces matensis* DIC-108 菌株之 β -1,3-葡聚五糖生產水解糖苷酵素(Laminaripentaose-producing β -1,3-glucanase, LPHase)屬於糖苷水解酵素第64家族的水解酵素(EC 3.2.1.39),藉以單取代(single-displacement)反轉機制催化水解 β -1,3糖苷鍵結,並專一性地生產由五個葡萄糖所構成的laminaripentaose寡糖產物。將著重於該酵素的性質、催化功能、反應機構與催化重要殘基的鑑定,並進一步對此酵素的蛋白質晶體結構作解析與探討。

本研究首先,以24條人造設計之寡核苷酸引子,利用PCR技術,合成完整的LPHase人造基因,並重組建構於 pRSET_A表現載體上,後轉殖進入大腸桿菌BL21(DE3)系統中,以IPTG誘導過量表現。經過各離子交換層析管柱(SP、Q、CM)等純化處理,可以取得均質度達95%的酵素,酵素單體的分子量約為40 kDa左右。以自製膠狀卡德蘭膠(curdlan)為反應受質進行活性分析,實驗結果顯示重組之LPHase酵素在溫度55⁰C及pH 7.5~8.5為活性最佳區域。當溶液pH值小於3.5或是大於11.0後,酵素會呈現不穩定狀態。利用¹H-NMR觀測LPHase酵素催化水解受質糖的立體選擇性作用,為一似S_N2之單取代反轉構型機制。隨後我們以純化之LPHase酵素進行卡德蘭膠聚糖之水解反應,利用透析膜的孔洞大小來篩選生產高純度 laminaripentaose寡糖產物;並以化學合成具有芳香族離去基團之糖苷受質進行酵素催化反應速率之動力學研究。將合成之

NLPG糖苷受質在40⁰C, 50 mM磷酸緩衝溶液(pH 7.1)的反應環境下,

與LPHase酵素進行催化水解作用，其所得 K_m 以及 k_{cat} 分別為1.6 mM和 8.1 s^{-1} 。當LPHase酵素在各不同酸鹼值緩衝溶液中，其反應活性之pH-profile呈現一對稱鐘型曲線(bell-shaped curve)，由曲線得知調控LPHase酵素所扮演的兩個重要催化殘基之解離值 pK_{a1} 和 pK_{a2} 分別為6.0及10.1。隨後，將糖苷水解酵素家族GH-64中，所有子家族來源菌的胺基酸序列進行多重序列比對分析，發現了五個完全高保留度位置的胺基酸，分別為Asp¹⁴³、Glu¹⁵⁴、Asp¹⁷⁰、Asp³⁷⁶及Asp³⁷⁷。結合酵素之定點突變學，觀測各突變株酵素與受質卡德蘭膠水解的相對催化活性，並量測對合成之糖苷受質*p*-NLPG的反應初始速率變化；發現有兩突變株E154G和D170G酵素的反應速率 k_{cat}/K_m 值，降低約為野生株的1,700~2,000倍。接著以利用加入親核性陰離子試劑對兩突變株E154G和D170G酵素進行化學活性復活技術，結果得知突變株D170G酵素的催化反應活性，可被加入的疊氮陰離子所復活。並於液相質譜與氫核磁共振磁譜分析 α -laminaripentaosyl_azide產物的產生。鑑定出LPHase酵素在催化反應過程中，扮演一般鹼催化基團(親核性基)為Asp¹⁷⁰和一般酸催化基團為Glu¹⁵⁴。並配合LPHase酵素突變學與蛋白晶體結構，得知胺基酸Arg¹¹⁵，為影響此酵素在高pH值溶液的催化作用；和胺基酸Tyr²³²，輔助對扮演一般鹼催化基團附近水分子之氫鍵鍵結作用力有相當重要性。利用X-ray晶體繞射方式取得LPHase酵素完整晶體結構。分別收集來自各不同結晶長成之反應條件母液中，原始酵素與硒化甲硫胺酸酵素(SeMet-LPHase)的蛋白質晶體，利用多波長非尋常散射(MAD)的方式，收取解析度達1.62~2.3 Å的晶體繞射數據。鑑定出LPHase酵素晶體完整架構，是有6個 α -螺旋結構、18個 β -平板結構和1個 η 結構，以上下交錯之 β -平板結構的 β -桶狀區域及 α/β 混合區域所建構而成，為一大開口裂縫(open groove)內切型外觀結構之糖苷水解酵素。由蛋白複合體晶體的結構模子，判定在酵素催化中心含至少五個糖苷分子以上鍵結的受質結合次單位區域。自聚糖鏈還原端向非還原端一方，由扮演一般鹼催化Asp¹⁷⁰和一般酸催化Glu¹⁵⁴的兩重要殘基，以似 S_N2 之單取代反轉催化機制的外切型態進行水解反應，形成以 β -1,3鍵結而成的專一laminaripentaose寡糖產物。兩催化殘基之胺基酸立體空間距離約為 $8 \pm 0.5\text{ \AA}$ 。

Catalytic mechanistic and identification of essential residues of Glycohydrolase in family GH-29 and GH-64

Student : Sheng-Wen Liu

Advisor : Dr. Yaw-Kuen Li

Department of Applied Chemistry
National Chiao Tung University

Part I : Expression, mutagenesis, mechanistic study and identification of essential residues of human α -L-Fucosidase in family GH-29



ABSTRACT

Fucosylated glycoconjugates play critical roles in various biological processes, but the limited availability of α -L-Fucosidase hampers investigations at a molecular level. This thesis aims to clone and express human Fucosidase .

A gene from human encoding α -L-fucosidase (Fuc) was cloned into pET22b(+) plasmid. Protein was successfully expressed in *E. coli* BL21 (DE3). After applying a series of ion-exchange and gel-filtration chromatography purification steps, recombinant *h*-Fuc with 95% homogeneity can be obtained. The molecular weight of the enzyme was analyzed by SDS-PAGE to be about 50 kDa. The optimal temperature of *h*-Fuc was 70 °C and the optimal pH was 4.5 and 6.5. The *h*-Fuc was stable at pH 3.0~6.0, while it was unstable at 75 °C or high. The catalytic mechanism of *h*-Fuc was confirmed a S_N1-like with two-step double displacement of retaining enzyme by transglycosylation and ¹H-NMR

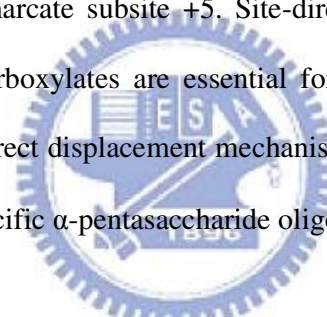
spectroscopy. Based on careful sequence alignment of GH-29 enzymes and extensive structure analysis of the close homologues of *h*-Fuc, nine residues of glutamate and aspartate in *h*-Fuc were selected for mutagenic study to determine the essential residues. Among the mutants, D225N, E289Q and E289G lost catalytic activity significantly; their k_{cat} values are 1/5,700, 1/430 and 1/340, respectively, of that of the wild-type enzyme. Based on k_{cat} values of aryl- α -L-fucopyranosides catalyzed by wild-type α -L-fucosidase, a small Brønsted constant, $\beta_{lg} = -0.13$, was derived, indicating that the rate-limiting step of the enzymatic reaction is fucosylation. The Brønsted plot for k_{cat}/K_m for the E289G mutant is linear with $\beta_{lg} = -0.93$, but that for k_{cat} is biphasic, with β_{lg} for poor substrates being -0.88 and for activated substrates being -0.11 . The small magnitude of β_{lg} for the activated substrates may indicate that the rate-limiting step of the reaction is defucosylation, whereas the large magnitude of the latter β_{lg} value for the poor substrates indicates that the rate-limiting step of the reaction becomes fucosylation. The kinetic outcomes support an argument that Asp225 functions as a nucleophile and Glu289 as a general acid/base catalyst. As further evidence, azide significantly reactivated D225G and E289G, and $^1\text{H-NMR}$ spectral analysis confirmed the formation of β -fucosyl azide and α -fucosyl azide in the azide rescues of D225G and E289G catalyses, respectively. As direct evidence to prove the function of Glu289, an accumulation of fucosyl-enzyme intermediate was detected directly through ESI/MS analysis.

Part II : Artificial gene cloning · protein mutagenesis and crystal structure
study and identification of essential residues of LPHase from
***Streptomyces matensis* DIC-108 in family GH-64**

ABSTRACT

An artificial gene of laminaripentaose-producing β -1,3-glucanase (LPHase) from *Streptomyces matensis* DIC-108 was reconstructed by PCR and overexpressed in *E. coli*. Although the polypeptide sequence of LPHase exhibits significant similarity with the catalytic domains of β -1,3-glucanase of *Arthrobacter sp. YCWD3* and *Cellulosimicrobium cellulans*, it uniquely catalyzes the hydrolysis of β -1,3-glucans to release laminaripentasaccharide as the predominant product. The recombinant wild-type enzyme and mutants were purified to >90% homogeneity by ionic-exchange chromatography. The optimal temperature of the LPHase was 55 °C and the optimal pH was 8.5. The LPHase was stable at pH 5.0~9.0, while it was unstable at 65 °C or higher. The catalysis of LPHase is confirmed to follow a one-step single displacement mechanism by ¹H-NMR spectroscopy. *p*-Nitrophenyl- β -1,3-laminaripentaopyranoside (*p*-NPLPG) was synthesized to facilitate the kinetic analysis. Michaelis constant (K_m) and catalytic activity were determined with *p*-NPLPG and were found to be 1.6 mM and 8.1 s⁻¹, respective. To determine the amino acid residues essential for the catalysis of LPHase, more than 10 residues including five highly conserved residues, D143, E154, D170, D376 and D377, were mutated. Among the mutants, E154 and D170 mutants, such as E154Q, E154G, D174N, and D174G, significantly lost their catalytic activity. Further investigation with chemical rescue on E154G and D174G confirmed that E154 and D170 function as the general acid and the general base in the LPHase catalysis, respectively. This study

provided the first hand information on identification of the essential residues GH-64 through kinetic examination. Further studies on structural and enzymatic characterizations were also conducted to understand the detail catalytic mechanism of LPHase. The crystal structure of LPHase was solved to 1.62 Å resolution using multiple-wavelength anomalous dispersion methods. The LPHase structure reveals a novel crescent-like fold; it consists of a barrel domain and a mixed (α/β) domain, including six α -helix, eighteen β -sheet, and one η structure, forming a wide-open groove between the two domains. The liganded crystal structure was also solved to 1.80 Å, showing limited conformational changes. Within the wide groove, molecular modeling using a laminarihexaose as a substrate suggests roles for Glu¹⁵⁴ and Asp¹⁷⁰ as acid and base catalysts, respectively, whereas the side chains in active site demarcate subsite +5. Site-directed mutagenesis of Glu¹⁵⁴ and Asp¹⁷⁰ confirms that both carboxylates are essential for catalysis. Together, our results suggest that LPHase uses a direct displacement mechanism involving Glu¹⁵⁴ and Asp¹⁷⁰ to cleave a β -1,3-glucan into specific α -pentasaccharide oligomers.



目 錄

謝誌.....	i
序言.....	ii
中文摘要.....	iv
英文摘要.....	viii
目 錄.....	xii
表目錄.....	xxiii
圖目錄.....	xxv

第一部分：家族 29 之人類 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素的蛋白質表現、突變以及催化反應機制和重要殘基的研究與探討

第一章 緒論.....	2
1-1 α -L-岩藻糖(α -L-fucose)之生物功能簡介.....	2
1-2 哺乳類動物 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素的概述.....	5
1-2-1 哺乳類動物之 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素介紹.....	5
1-2-2 哺乳類動物之 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素動力學上的特質.....	7
1-2-3 人類 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素的介紹.....	8
1-3 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素(α -L-Fucosidase)之性質分類簡介.....	10
1-4 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素之研究.....	15
1-5 論文研究動機.....	23
第二章 實驗方法.....	27
2-1 藥品器材與儀器.....	27

2-2	基因來源.....	28
2-3	勝任細胞(competent cell)的製備.....	28
2-4	轉型勝任細胞(transformation).....	28
2-5	人類 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素的基因重組與定點突變.....	29
2-5-1	基因的放大.....	29
2-5-2	人類 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素基因與表現載體 pET22b(+)的接合 (ligation).....	31
2-5-3	基因定序(sequencing).....	31
2-5-4	定點突變(site-directed mutagenesis).....	32
2-5-5	定點突變之引子設計.....	33
2-5-6	定點突變操作步驟.....	34
2-6	菌種保存.....	35
2-7	重組之人類 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素於大腸桿菌系統中的表現 (expression).....	35
2-7-1	質體DNA的轉型.....	35
2-7-2	重組人類 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素的誘導與生長曲線測試.....	35
2-7-3	重組人類 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素的活性測試.....	36
2-8	重組人類 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素之純化.....	36
2-8-1	菌種來源.....	36
2-8-2	胞內粗提取液的取得.....	36
2-8-3	銨鹽沉澱蛋白質.....	37
2-8-4	HiTrap SP 陽離子交換樹脂管柱層析.....	38
2-8-5	HiTrap Q 陰離子交換樹脂管柱層析.....	38
2-8-6	凝膠樹酯 G-75 管柱層析.....	39
2-9	建構含 6-His 胜肽區域之 <i>h</i> -Fuc 突變株 D225G/N、E289G/Q 酵素 表現質體.....	40
2-10	SDS-PAGE 決定蛋白質均質度(homology)	41

2-11	蛋白質分子量與濃度的測定.....	43
2-11-1	液相層析-質譜儀(LC-MASS)測定蛋白質的分子量.....	43
2-11-2	檢量線的建立.....	43
2-11-3	純化的野生株與各突變株酵素之濃度測定.....	43
2-12	芳香基團 α -L-岩藻糖苷化合物及抑制藥物之衍生物的合成.....	44
2-12-1	一般敘述.....	44
2-12-2	對硝基苯 α -L-岩藻糖苷化合物的合成 (<i>p</i> -nitrophenyl- α -L-fucopyranoside, pNPF).....	45
2-12-3	不同芳香基團 α -L-岩藻糖苷化合物的合成.....	48
2-12-4	2-氯對硝基苯 α -L-岩藻糖苷化合物的合成 (2-chloro-4-nitrophenyl- α -L-fucopyranoside, CNPF).....	48
2-12-5	抑制劑 <i>O</i> -hydroxyl-1-(2,3-epoxypropyl)- α -L-fucopyranoside (EPFP)之 合成.....	50
2-12-6	抑制劑 Fuconolactone 的合成.....	51
2-13	重組人類 α -L-岩藻糖水解糖苷酶的特性研究.....	52
2-13-1	溫度對酶活性的影響.....	52
2-13-2	溫度對酶穩定度的影響(Thermostability).....	52
2-13-3	酸鹼度對酶活性的影響.....	53
2-13-4	酸鹼度對酶穩定度的影響(pH stability).....	54
2-13-5	金屬離子及試劑對酶活性的影響.....	55
2-14	氫核磁共振光譜研究人類 α -L-岩藻糖水解糖苷酶催化反應之立 體選擇性.....	55
2-15	氫核磁共振光譜研究人類 α -L-岩藻糖水解糖苷酶共同反應中間 體.....	56
2-16	人類 α -L-岩藻糖水解糖苷酶動力學 k_{cat} 、 K_m 之研究.....	57
2-16-1	人類 α -L-岩藻糖水解糖苷酶對不同糖基化合物受質反應之專一 性.....	58

2-16-2	酸鹼度對野生株與突變株之人類 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素活性 k_{cat} 、 K_m 影響(pH-profile 的測定)	58
2-16-3	野生株與突變株之人類 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素對不同非糖基受質催化活性 k_{cat} 、 K_m 影響(Brønsted plot 的測定)	59
2-17	抑制劑與酵素之抑制作用與解離常數測定.....	60
2-18	陰離子親核劑對人類 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素活性的影響.....	61
2-19	利用 $^1\text{H-NMR}$ 觀測突變株酵素以化學復活反應後之疊氮-岩藻糖產物.....	62
2-20	化學復活法下突變株 E289G 酵素對不同芳香族離去基團受質之反應性.....	63
2-21	CD (circular dichroism) 光譜觀測野生株和突變株之二級結構.....	64
2-22	蛋白質序列比對與二級結構分析.....	65

第三章 結果與討論..... 66

3-1	建構重組人類 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素之表現系統.....	66
3-2	重組人類 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素的誘導.....	68
3-3	重組人類 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素的純化.....	69
3-4	重組人類 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素的性質.....	71
3-4-1	蛋白質的分子量.....	71
3-4-2	蛋白質濃度的決定.....	72
3-5	人類 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素之蛋白質特性與催化性質討論.....	73
3-5-1	酸鹼度對人類 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素反應活性的影響.....	74
3-5-2	酸鹼度對人類 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素穩定性的影響.....	75
3-5-3	溫度對人類 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素活性的影響.....	76
3-5-4	人類 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素的熱穩定性.....	76
3-5-5	金屬離子及試劑對人類 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素活性的影響.....	78

3-6	芳香類- α -L-岩藻糖糖苷化合物(aryl- α -L-fucopyranosides)的合成..79
3-6-1	酵素催化受質之特異性(substrate specificity)81
3-7	酵素催化速率決定步驟之探討.....82
3-8	人類 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素催化反應機制之研究.....85
3-8-1	以氫核磁共振儀研究人類 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素的立體選擇性.....86
3-8-2	共同反應中間體(Common intermediate)88
3-9	酸鹼度對重組人類 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素活性之影響.....90
3-10	人類 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素之蛋白結構模擬與催化重要殘基序列二級結構比對分析.....94
3-11	抑制劑之研究.....103
3-11-1	競爭性抑制作用.....103
3-11-2	不可逆性抑制作用.....106
3-12	人類 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素突變株之純化及活性分析.....110
3-13	α -L-岩藻糖水解糖苷酵素突變株之二級結構與 K_m 關係之探討...111
3-14	人類 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素親核性催化殘基位置的鑑定.....112
3-15	人類 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素一般酸/鹼催化殘基之鑑定.....117
3-16	溶液酸鹼度對 Glu ²⁸⁹ 突變株酵素的催化活性影響之研究.....120
3-17	不同陰離子親核劑對 Glu ²⁸⁹ 突變株酵素之反應.....123
3-18	疊氮對突變株 E289G 酵素反應之影響.....125
3-19	突變株 E289G 酵素之 Brønsted plot 探討.....129
3-20	質譜儀鑑定突變株 E289G 酵素與受質反應作用之中間體.....132
	第四章 結論.....134

第二部分：家族 64 鏈黴菌 DIC-108 之 β -1,3-葡聚五糖生產水解
糖苷酵素的基因選殖、蛋白質表現與突變以及蛋白質
結構和重要殘基的研究與探討

第五章 緒論.....	138
5-1 β -葡聚糖簡介.....	138
5-2 β -1,3-葡聚糖應用於醫藥.....	142
5-3 β -1,3-葡聚糖水解糖苷酵素(β -1,3-Glucanase)之簡介.....	146
5-4 β -1,3-葡聚糖水解糖苷酵素的分類簡介.....	147
5-5 反應受質卡德蘭膠(Curdlan)之介紹.....	152
5-6 β -1,3-葡聚糖水解糖苷酵素之研究.....	153
5-7 人造基因技術簡介.....	158
5-8 <i>Streptomyces matensis</i> 菌株與 β -1,3-葡聚五糖生產水解糖苷酵素(LPHase)之簡介.....	161
5-9 本論文的研究動機.....	164
第六章 實驗方法.....	165
6-1 藥品器材與儀器.....	165
6-2 β -1,3-葡聚五糖生產水解糖苷酵素人造基因之建構.....	166
6-2-1 整段人造基因之設計.....	166
6-2-2 寡核苷酸模板(oligonucleotide template)之設計.....	166
6-2-3 基因的放大.....	169
6-2-4 β -1,3-葡聚五糖生產水解糖苷酵素之人造基因選殖.....	170
6-3 勝任細胞(competent cell)的製備.....	171
6-4 轉型勝任細胞(transformation).....	172

6-5	基因定序(sequencing)	172
6-6	β -1,3-葡聚五糖生產水解糖苷酵素的人造基因重組與定點突變..	173
6-6-1	β -1,3-五糖生產水解糖苷酵素基因與表現載體 pRSET_A 的接合 (ligation).....	173
6-6-2	定點突變(site-directed mutagenesis).....	174
6-6-3	定點突變之引子設計.....	175
6-6-4	定點突變操作步驟.....	177
6-7	菌種保存.....	178
6-8	野生株與突變株 β -1,3-葡聚五糖生產水解糖苷酵素在大腸桿菌系統 的過量表現(overexpression)	178
6-8-1	質體 DNA 的轉型.....	178
6-8-2	重組酵素的誘導與生長曲線測試.....	178
6-8-3	重組酵素的活性測試.....	179
6-9	重組 β -1,3-葡聚五糖生產水解糖苷酵素之純化.....	180
6-9-1	菌種來源.....	180
6-9-2	胞內粗提取液的取得.....	180
6-9-3	HiTrap SP 陽離子交換樹脂管柱層析.....	181
6-9-4	HiTrap Q 陰離子交換樹脂管柱層析.....	181
6-9-5	CM Sepharose™ 離子交換樹脂快速層析管柱.....	182
6-9-6	SDS-PAGE 決定蛋白質均質度(homology)	182
6-10	蛋白質分子量與濃度的測定.....	183
6-10-1	液相層析-質譜儀(LC-MASS)測定蛋白質的分子量.....	183
6-10-2	檢量線的建立.....	183
6-10-3	純化的野生株與各突變株酵素之濃度測定.....	183
6-11	β -1,3-葡聚五糖生產水解糖苷酵素對不同糖苷組成、結構之長鏈聚 糖受質反應專一性和水解產物的分析.....	184
6-11-1	膠狀卡德蘭膠水解作用反應分析.....	184

6-11-2	寡糖水解作用反應的評估.....	185
6-12	Laminaripentaose (β -D-1,3-葡聚五糖葡萄糖苷)之製備.....	185
6-13	芳香基團 β -1,3-五糖醣苷化合物以及抑制藥物之衍生物的合成	186
6-13-1	一般敘述.....	186
6-13-2	對硝基苯 β -D-1,3-葡聚五糖葡萄糖苷化合物 (<i>p</i> -nitrophenyl- β -D-1,3-pentagluco-pyranoside)的合成.....	187
6-13-3	<i>O</i> -hydroxyl-1-(2,3-epoxypropyl)- β -1,3-D-pentagluco-pyranoside (EPLPG)的合成.....	191
6-13-4	1- <i>O</i> -(2-difluoromethyl-4-nitrophenyl)- β -1,3-D-pentagluco-pyranoside (2DFMNLPG)的合成.....	193
6-14	重組之 β -1,3-葡聚五糖生產水解糖苷酵素的特性研究.....	195
6-14-1	溫度對酵素活性的影響.....	195
6-14-2	溫度對酵素穩定度的影響(Thermostability)	195
6-14-3	酸鹼度對酵素活性的影響.....	196
6-14-4	酸鹼度對酵素穩定度的影響(pH stability).....	197
6-14-5	金屬離子及試劑對酵素活性的影響.....	198
6-15	β -1,3-葡聚五糖生產水解糖苷酵素動力學 k_{cat} 、 K_m 之研究.....	199
6-15-1	酸鹼度對野生株與突變株之 β -1,3-葡聚五糖生產水解糖苷酵素活性 k_{cat} 、 K_m 影響(pH-profile 的測定)	200
6-15-2	陰離子親核劑對突變株酵素活性的影響.....	200
6-16	抑制劑與酵素之抑制作用活性測定.....	201
6-17	氫核磁共振光譜研究 β -1,3-葡聚五糖生產水解糖苷酵素突變株 D170G 之化學活性復活，以觀測 azide 反應後之產物立體選擇 性.....	202
6-18	氫核磁共振光譜研究 β -1,3-葡聚五糖生產水解糖苷酵素突變株 D170E 反應後之產物立體選擇性.....	203
6-19	建構含標示鍵結之 β -1,3-葡聚五糖生產水解糖苷酵素突變株	

	D170C 之反應活性、機制之研究.....	203
6-20	CD(circular dichroism)光譜觀測野生株和突變株之二級結構.....	204
6-21	β -1,3-葡聚五糖生產水解糖苷酵素之蛋白質晶體研究.....	205
6-21-1	自然野生株(wild type)蛋白質表現.....	205
6-21-2	硒化甲硫胺酸(Selenomethionine)蛋白質表現.....	205
6-21-3	晶體培養與鑑定.....	206
6-21-4	蛋白質結構圖形繪製.....	206
6-21-5	蛋白質序列比對與結構分析.....	206
6-21-6	三級結構(Tertiary structure)的比對.....	207

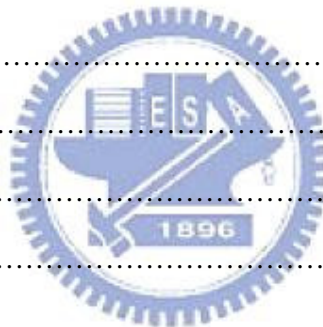
第七章 結果與討論.....208

7-1	β -1,3-葡聚五糖生產水解酵素之酵素動力學與重要催化殘基鑑定 之研究.....	208
7-1-1	β -1,3-葡聚五糖生產水解酵素之人造基因建構.....	208
7-1-2	建構重組 β -1,3-葡聚五糖生產水解酵素之表現系統.....	210
7-1-3	重組 β -1,3-葡聚五糖生產水解糖苷酵素的誘導.....	212
7-1-4	重組 β -1,3-葡聚五糖生產水解糖苷酵素的純化.....	213
7-1-5	重組 β -1,3-葡聚五糖生產水解糖苷酵素的性質.....	216
7-1-5-1	蛋白質的分子量.....	216
7-1-5-2	蛋白質濃度的決定.....	217
7-1-6	β -1,3-葡聚五糖生產水解糖苷酵素的蛋白質與催化作用特性	217
7-1-6-1	酸鹼度對野生株 LPHase 酵素反應活性的影響.....	218
7-1-6-2	酸鹼度對野生株 LPHase 酵素穩定性的影響.....	219
7-1-6-3	溫度對 β -1,3-葡聚五糖生產水解糖苷酵素活性的影響.....	220
7-1-6-4	β -1,3-葡聚五糖生產水解糖苷酵素的熱穩定性.....	220
7-1-6-5	金屬離子及試劑對野生株 LPHase 催化活性的影響.....	222

7-1-6-6	β -1,3-葡聚五糖生產水解糖苷酵素對受質作用之特異性 (substrate specificity).....	223
7-1-7	β -1,3-葡聚五糖生產水解糖苷酵素之水解反應產物分析.....	225
7-1-8	酵素法製備 β -1,3-葡聚五糖(Laminaripentaose)	229
7-1-9	芳香族官能基- β -D-1,3-葡聚五糖苷化合物受質的合成.....	229
7-1-10	鑑定 LPHase 酵素之重要催化殘基位置的研究方法.....	231
7-1-11	β -1,3-葡聚五糖生產水解糖苷酵素突變株之純化及活性分析...235	
7-1-12	β -1,3-葡聚五糖生產水解糖苷酵素之動力學速率研究.....	238
7-1-13	酸鹼度對 LPHase 野生株與突變株酵素之活性影響.....	240
7-1-14	抑制劑的研究.....	243
7-1-15	陰離子親核性試劑 對 LPHase 突變株酵素催化反應之影響.....	246
7-1-16	E154D 和 D170E 兩突變株酵素對催化反應之影響研究.....	252
7-2	β -1,3-葡聚五糖生產水解酵素之晶體結構研究.....	259
7-2-1	酵素晶體成長、相位的篩選與尋找.....	259
7-2-2	β -1,3-葡聚五糖生產水解酵素結構分析.....	265
7-2-3	β -1,3-葡聚五糖生產水解酵素類似結構之探討.....	268
7-2-4	β -1,3-葡聚五糖生產水解酵素結構中重要殘基判定之研究.....	277
7-2-5	酵素催化中心對影響水解反應作用相關殘基位置之研究.....	280
第八章 結論.....		287
第九章 參考文獻.....		290

附錄

附錄 I.....	313
附錄 II.....	314
附錄 III.....	315
附錄 IV.....	317
附錄 V.....	318
附錄 VI.....	319
附錄 VII.....	326
附錄 VIII.....	328
附錄 IX.....	329
附錄 X.....	330
附錄 XI.....	332
附錄 XII.....	333
附錄 XIII.....	335
附錄 XIV.....	338
附錄 XV.....	339
附錄 XVI.....	340
附錄 XVII.....	341



表目錄

表 1-1	哺乳類動物的 α -L-岩藻糖苷水解酵素特性比較.....	5
表 1-2	哺乳類動物的 α -L-岩藻糖苷水解酵素活性比較.....	8
表 1-3	α -L-岩藻糖苷水解酵素各家族之酵素催化機制、殘基與結構比較..	15
表 3-1	重組蛋白質 <i>h</i> -Fuc 酵素之純化倍率表.....	69
表 3-2	以 Vector NTI 軟體分析重組之 <i>h</i> -Fuc 酵素分子量和性質.....	71
表 3-3	金屬離子及試劑對野生株 <i>h</i> -Fuc 酵素活性的影響.....	78
表 3-4	野生株 <i>h</i> -Fuc 酵素對各種糖苷化合物催化反應之 K_m 及 k_{cat} 值.....	81
表 3-5	野生株 α -L-岩藻糖苷水解酵素對岩藻糖苷化合物之 K_m 與 k_{cat} 值...	83
表 3-6	轉糖反應之各重要糖基 NMR 積分訊號.....	89
表 3-7	野生株 <i>h</i> -Fuc 與各可逆、不可逆抑制劑的抑制常數(K_i)	105
表 3-8	<i>h</i> -Fuc 野生株與各突變株酵素對受質 pNPF 反應之 Michaelis-Menten 參數表.....	110
表 3-9	為 <i>h</i> -Fuc 野生株與突變株 D225G，於含有 1 M 疊氮鈉的 pH 6.8，磷酸 緩衝溶液反應環境條件下，進行催化反應之動力學數據表.....	114
表 3-10	為 <i>h</i> -Fuc 野生株和突變株 E289Q 在不同反應環境條件下，進行催化反 應之動力學數據表.....	124
表 3-11	突變株 E289G 對各不同芳香族離去基岩藻糖苷化合物之 K_m 與 k_{cat} 值.....	129
表 3-12	突變株 E289G 在含 500 mM azide 下對不同離去基受質反應之 K_m 及 k_{cat}	129
表 5-1	β -1,3-葡聚糖水解糖苷酵素各家族之酵素催化機制、殘基與結構比 較.....	154
表 7-1-1	重組蛋白質 LPHase 酵素之純化倍率表.....	213
表 7-1-2	以 Vector NTI 軟體分析重組之 LPHase 酵素分子量和性質.....	216
表 7-1-3	金屬離子及試劑對野生株 LPHase 酵素活性的影響.....	222

表 7-1-4	野生株 LPHase 酵素和各不同糖苷分子、結構的長鏈聚糖之相對反應 活性.....	224
表 7-1-5	LPHase 之野生株與各突變株酵素對卡德蘭膠之相對作用活性.....	225
表 7-1-6	LPHase 之野生株與各突變株酵素對糖苷受質 <i>p</i> -NLPG 反應之 Michaelis-Menten 參數表.....	239
表 7-1-7	為 wild type、E154D、D170E 和兩修飾突變株 D170C LPHase，與合 成之糖苷受質 <i>p</i> -NLPG，所進行催化反應之 K_m 與 k_{cat} 動力學數據 表.....	253
表 7-2-1	為承接圖 7-2-12 中，各糖苷水解酵素家族結構之酵素名、菌種來源、 PDB 號碼、作用受質結構與產物.....	276
表 7-2-2	為承接圖 3-2-15 之 LPHase 晶體結構中各胺基酸位置，於胺基酸側鏈 末端上彼此間最短兩原子之距離.....	281



圖目錄

圖 1-1	L-fucose 糖基分子結構.....	2
圖 1-2	Typical mammalian complex N-glycans.....	3
圖 1-3	糖苷水解酵素的反應催化機制示意圖.....	13
圖 1-4	家族 GH-29, <i>Thermotoga maritima</i> 之 α -L-岩藻糖水解酵素之 3D 晶體結構.....	14
圖 1-5	家族 GH-95 <i>Bifidobacterium bifidum</i> 之 α -1,2-L-岩藻糖水解酵素之 3D 晶體結構.....	14
圖 1-6	家族 GH-29, <i>T. maritima</i> 之岩藻糖-蛋白質酵素複合體晶體結構.....	16
圖 1-7	糖苷水解酵素常用的失活劑結構圖.....	17
圖 1-8	<i>h</i> -Fuc 之 Asp 突變株與失活劑之反應圖.....	18
圖 1-9	親和性標示物與串聯質譜的定位流程圖.....	19
圖 1-10	CD 光譜中, 蛋白質二級結構在各波長吸收下之 θ 變化值.....	20
圖 1-11	為 <i>h</i> -Fuc 酵素之化學復活方法(rescure)的機制圖.....	22
圖 1-12	α -L-岩藻糖水解糖苷酵素反應機制推測以及過渡態架構.....	25
圖 1-13	人類岩藻糖水解酵素蛋白質之 3D-CPHmodel 模擬結構.....	26
圖 2-1	芳香類 α -L-岩藻糖苷化合物合成反應步驟之試劑與條件:.....	45
圖 2-2	CNPF 合成反應步驟之試劑與條件:.....	48
圖 2-3	為 EPFP 之合成步驟與試劑.....	50
圖 2-4	Fuconolactone 合成反應步驟之試劑與條件:.....	51
圖 3-1	重組 <i>h</i> -Fuc 與人類原生肝細胞組織 Fuc(NCBI: AAA52481)之蛋白質序列比較.....	67
圖 3-2	表現載體 pET22b(+)與人類 <i>h</i> -Fuc 基因剪接步驟示意圖.....	67
圖 3-3	重組 <i>h</i> -Fuc 酵素於大腸桿菌 BL21(DE3)之成長表現與活性曲線.....	68
圖 3-4	野生株 <i>h</i> -Fuc 酵素之各步驟離子交換樹脂層析結果圖.....	70
圖 3-5	重組蛋白 <i>h</i> -Fuc 酵素分子量之質譜分析圖.....	71

圖 3-6	重組蛋白 <i>h</i> -Fuc 酵素之 SDS-PAGE.....	73
圖 3-7	酸鹼度對野生株 <i>h</i> -Fuc 酵素反應活性的影響.....	74
圖 3-8	野生株 <i>h</i> -Fuc 酵素在 25 °C 中，酸鹼度對穩定性的影響.....	75
圖 3-9	溫度對野生株 <i>h</i> -Fuc 酵素反應活性與穩定度的影響.....	77
圖 3-10	野生株 <i>h</i> -Fuc 酵素之 Brønsted plot.....	84
圖 3-11	人類 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素可能的反應機構簡圖.....	85
圖 3-12	受質 pNPF 之糖基 C 1 上氫原子之化學位移.....	86
圖 3-13	以氫核磁共振儀追縱 <i>h</i> -Fuc 酵素催化水解受質 pNPF 之反應立體選擇性.....	87
圖 3-14	經由共同反應中間體之推測 <i>h</i> -Fuc 酵素之催化反應途徑.....	88
圖 3-15	野生株 <i>h</i> -Fuc 酵素與 pNPF/MeOH 所進行之轉糖反應.....	90
圖 3-16	以(A)Michaelis-Menten equation 作圖法和(B)雙倒數作圖法，求解酵素對 pNPF 之 K_m 及 k_{cat}	92
圖 3-17	酸鹼度對重組之野生株 <i>h</i> -Fuc 酵素催化活性之影響.....	93
圖 3-18	重組之野生株 <i>h</i> -Fuc 酵素之不同酸鹼度的 k_{cat} 與 k_{cat}/K_m	93
圖 3-19	原生肝臟人類 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素活性與 pH 值的關係圖.....	93
圖 3-20	家族 GH-29 <i>T. maritima</i> 與真核生物之 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素之演化樹狀圖.....	95
圖 3-21	受質糖與岩藻糖水解酵素蛋白質鍵結之 3D 結構圖.....	96
圖 3-22	利用各來源之岩藻糖水解糖苷酵素部份胺基酸序列，以 MuSiC-ME 軟體進行蛋白質二級結構比對.....	98
圖 3-23	<i>T. maritima</i> α -L-岩藻糖水解酵素之複合晶體結構，於活性中心與岩藻糖有鍵結作用力之各胺基酸位置.....	101
圖 3-24	Fuconolactone 的抑制常數 K_i 值.....	105
圖 3-25	野生株 <i>h</i> -Fuc 酵素與抑制劑 EPFP，作用 4 小時後的質譜圖.....	107
圖 3-26	野生株 <i>h</i> -Fuc 酵素與抑制劑 EPFP 之抑制速率常數圖.....	108
圖 3-27	<i>h</i> -Fuc 之野生株與各突變株酵素 CD 光譜比較圖.....	111

圖 3-28	野生株與突變株 D225N 酵素對受質 pNPF 水解反應之 pH-profile..	113
圖 3-29	疊氮於突變株 D225G 酵素之化學復活反應，扮演的催化角色示意圖.....	115
圖 3-30	乙醯化的 β -fucosyl azide 反應產物之 $^1\text{H-NMR}$ 圖譜.....	116
圖 3-31	<i>h</i> -Fuc 酵素之野生株(\circ)與突變株 E289Q(\square)、E79G(\bullet) pH-profile 活性變化.....	121
圖 3-32	不同濃度之各陰離子親核劑對突變株 E289G 酵素，反應速率 k_{cat}/K_m 值之影響.....	124
圖 3-33	突變株 E289G 酵素在不同濃度疊氮下，對不同 aryl- α -L-岩藻糖苷化合物的水解反應速率之 k_{cat} 值.....	126
圖 3-34	突變株 E289G 酵素在親核性陰離子疊氮下，與受質 CNPF (7.5 mM) 於 27 °C、pD 6.0 隨時間作用之 $^1\text{H-NMR}$ 光譜圖.....	128
圖 3-35	疊氮於突變株 E289G 酵素之化學復活反應中可能扮演的角色.....	128
圖 3-36	<i>h</i> -Fuc 野生株(\circ)與突變株 E289G(\bullet)酵素之 Brønsted plot.....	130
圖 3-37	突變株 E289G 在(\bullet):沒有疊氮與(\circ):500 mM 疊氮下之 Brønsted plot...	130
圖 3-38	突變株 E289G 酵素與受質 pNPF 反應 8 小時後的蛋白質分子量質譜分析圖.....	133
圖 5-1	各類不同結構組成之葡聚糖.....	138
圖 5-2	不同分支度之 β -1,3-葡聚糖結構.....	141
圖 5-3	β -1,3-葡聚糖(β -1,3-glucan)投藥產生誘發免疫反應的方式與路徑...	145
圖 5-4	家族 GH-5、16、17 之 β -1,3-葡聚糖水解醣苷酵素 3D 晶體結構....	150
圖 5-5	在醣苷水解酶中的主要三種活化中心(active site)	151
圖 5-6	卡德蘭膠(Curdlan)之化學結構.....	152
圖 5-7	以 X 射線衍射之 β -1,3-葡聚多糖晶體結構.....	153
圖 5-8	家族 GH- 55 之 β -1,3-葡聚糖水解醣苷酵素 3D 晶體結構.....	154
圖 5-9	Edge 之人造基因設計概念.....	158
圖 5-10	Prodromou 發展之 Recursive PCR 於基因合成.....	159

圖 5-11	Eileen 改良後之 Recursive PCR 概念示意圖.....	159
圖 5-12	本實驗人造基因之設計原理.....	160
圖 5-13	β -1,3-葡聚五糖生產水解糖苷酵素之催化反應機制示意圖.....	163
圖 7-1-1	以 PCR 放大所設計之人造基因引子產物.....	209
圖 7-1-2	人造 LPHase 與原生菌種 <i>S. matensis</i> DIC-108(NCBI : BAA34349)之蛋白質序列比較.....	211
圖 7-1-3	表現載體 pRSET_A 與人造基因 LPHase 剪接步驟示意圖.....	211
圖 7-1-4	重組蛋白 LPHase 酵素於大腸桿菌 BL21(DE3)的成長表現與活性曲線.....	212
圖 7-1-5	重組蛋白 LPHase 酵素之各純化步驟層析結果圖.....	214
圖 7-1-6	重組蛋白 LPHase 酵素之 SDS-PAGE.....	215
圖 7-1-7	重組蛋白 LPHase 酵素分子量之質譜分析圖.....	216
圖 7-1-8	酸鹼度對野生株 LPHase 酵素反應活性的影響.....	218
圖 7-1-9	野生株 LPHase 酵素在 25 °C 中，酸鹼度對穩定性的影響.....	219
圖 7-1-10	溫度對野生株 LPHase 酵素反應活性與穩定度的影響.....	221
圖 7-1-11	以 LC/ESI-MS 分析，LPHase 酵素和卡德蘭膠反應後之水解產物	224
圖 7-1-12	以 LC/MS 和 HPLC 分析，LPHase 酵素與卡德蘭膠在各不同時間點之反應產物和生成量.....	226
圖 7-1-13	甲基修飾化糖苷受質 1-O-methyl- β -1,3-laminarihexaose(和-laminariheptaose)分別與野生株 LPHase 酵素，在各不同反應時間點之 LC/MS 產物分析圖.....	228
圖 7-1-14	糖苷 1-O-methyl- β -1,3-laminariheptaose 在各不同鍵結位置所斷裂之分子量.....	228
圖 7-1-15	糖苷受質合成策略示意圖.....	227
圖 7-1-16	家族 GH-64 各菌種 β -1,3-葡聚糖水解除糖苷酵素之演化樹狀圖.....	233
圖 7-1-17	糖苷水解酵素家族 GH-64 中，所有細菌(Bacteria)和真核生物(Eukaryota)之 β -1,3-葡聚糖水解除糖苷酵素的多重序列比對.....	234

圖 7-1-18	重組 LPHase 酵素野生株與各突變株之圓二色光譜比較.....	236
圖 7-1-19	LPHase 之野生株與 E154Q 和 D170N 兩突變株酵素，在各不同反應時間對卡德蘭膠受質之催化水解活性.....	237
圖 7-1-20	野生株與突變株酵素對糖苷受質 <i>p</i> -NLPG 水解反應之 pH-profile...	241
圖 7-1-21	LPHase 野生株酵素在含有抑制劑的溶液中，隨存放之反應時間點與受質卡德蘭膠進行水解作用的殘餘反應活性.....	245
圖 7-1-22	LPHase 突變株 E154G 和 D170G 酵素與膠狀卡德蘭膠，在含不同濃度之親核性陰離子作用下，酵素活性復活變化.....	247
圖 7-1-23	在含疊氮下，突變株 D170G 酵素與卡德蘭膠作用反應後的產物質譜分析.....	248
圖 7-1-24	野生株與含疊氮之突變株酵素，對糖苷受質 <i>p</i> -NLPG 催化反應之 pH-profile.....	249
圖 7-1-25	為突變株 D170G 酵素與 azide 作用之可能產物的示意機制圖.....	250
圖 7-1-26	突變株 D170G 酵素在含疊氮親核性陰離子下，與卡德蘭膠隨時間作用之 ¹ H-NMR 光譜.....	252
圖 7-1-27	突變株 D170E 酵素與卡德蘭膠隨時間作用之 ¹ H-NMR 光譜.....	254
圖 7-1-28	突變株 D170C 與醋酸碘和二硫代二乙酸進行鍵結反應之示意圖.....	256
圖 7-1-29	突變株 D170C 與各修飾試劑，作用反應後之分子量質譜分析圖.....	256
圖 7-1-30	LPHase 之野生株、突變株 D170C 與兩修飾突變株酵素，於含有或無乙醇下，與膠狀卡德蘭膠作用反應之活性變化.....	258
圖 7-1-31	修飾突變株酵素，與膠狀卡德蘭膠作用反應 10 小時後，產物質譜分析圖.....	258
圖 7-2-1	硒化甲硫胺酸酵素之蛋白質分子量質譜分析圖.....	260
圖 7-2-2	篩選所得到的蛋白質晶體 (A)原始 LPHase, (B) SeMet-LPHase....	261
圖 7-2-3	以 PyMOL 軟體繪製硒化甲硫胺酸(Selenomethionine / SeMet)	262

圖 7-2-4	LPHase 酵素跟甜味蛋白 (sweet tasting protein) Thaumatin 結構的疊置 (superposition)情形.....	262
圖 7-2-5	LPHase 酵素之(A)蛋白質晶體結構與(B)結構之拓樸圖(topology)	263
圖 7-2-6	LPHase 酵素結構的表面示意圖(surface representation)	264
圖 7-2-7	LPHase 酵素晶體結構中兩胺基酸 Cysteine 的位置.....	266
圖 7-2-8	LPHase 酵素結構在 Ramachandran Plot 屬不允許區域(disallowed region) 的胺基酸 Arg ³⁰⁸	267
圖 7-2-9	依據解出之 LPHase 蛋白質結構來預測糖苷水解酵素第 64 號家族序列相似度達 40 %以上之蛋白質二級結構.....	272
圖 7-2-10	LPHase 電子雲圖與 LPHase-糖苷受質複合體電子雲圖的比較.	273
圖 7-2-11	預測 LPHase 酵素晶體, 在凹型裂縫表面的二級區域結構中與受質糖可能有引力作用之胺基酸位置.....	273
圖 7-2-12	糖苷水解酵素家族中, 分屬內切型裂縫結構糖苷水解酵素之催化中心結構比較.....	275
圖 7-2-13	五個保守性之酸性胺基酸 (Asp ¹⁴³ 、Glu ¹⁵⁴ 、Asp ¹⁷⁰ 、Asp ³⁷⁶ 、Asp ³⁷⁷) 位於 LPHase 蛋白質三級結構中的相關位置.....	278
圖 7-2-14	預測之催化活性殘基 Glu ¹⁵⁴ , 分別與和 Asp ¹⁷⁰ 和 Asp ³⁷⁷ 各氧基間之相互距離.....	278
圖 7-2-15	LPHase 酵素催化中心, 相關重要反應作用胺基酸位置之平面示意圖.....	281
圖 7-2-16	LPHase 突變株 Arg ¹¹⁵ 酵素之 SDS-PAGE 和 CD 光譜比較圖.....	284
圖 7-1-17	LPHase 之野生株與突變株 R115Q 酵素的 pH-profile.....	285
圖 7-2-18	模擬 β-1,3-葡聚糖受質, 在酵素催化中心之結合單位及重要反應殘基之位置示意圖.....	286

第一部分

家族 29 之人類 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素的蛋白質表現、突變以及催化反應機制和重要殘基的研究與探討



第一章 緒論

1-1、 α -L-岩藻糖 (α -L-fucose) 之生物功能簡介

L-岩藻糖 (如圖 1-1 所示) 六碳糖的一種，又稱 6-脫氧-L-半乳糖 (6-deoxy-L-galactose)，並可以看做是一種甲基戊糖。自然界存在的岩藻糖絕大多數為 L-岩藻糖，D-構型的岩藻糖僅作為稀有糖，發現於一些糖苷類化合物中。L-岩藻糖較大量地存在於海藻及樹膠中，也發現於某些細菌的多糖中，通常從海藻中提取岩藻糖，先用酸處理，中和後，除去一些多苯化合物，可得 α -L-岩藻糖結晶，熔點 145°C 。

L-岩藻糖可在細胞表面及醣脂、醣肽中發現，其作為糖蛋白中糖鏈的組成部分，廣泛存在各類細胞表面的質膜蛋白質中以 N-linked 或為 O-linked 鍵結型式。岩藻糖比一般六碳糖在第六碳原子上少一個-OH 基團，所以岩藻糖比其他單糖親水性弱，而疏水性強一些。在生物體內血型種類的區別中，岩藻糖更是這類血型分類的重要標記。在哺乳類動物中，L-岩藻糖的醣苷分子調控許多特別的生物生理活性效應，其中包含了：(1) 神經傳導⁽¹⁾、(2) 血液的傳輸⁽²⁾、(3) 免疫調節：透過人體三種不同型態之選擇素(selectins)調節白血球與內皮組織之間的作用⁽²⁾、(4) 呼吸道感染之預防及治療：宿主-微生物之間的交互作用^(2, 3)、(5) 癌症之生長與抑制⁽⁴⁾、(6) 膠原蛋白之調節及一些生長、受精及訊號的傳遞…等⁽²⁾。也有部分的研究顯示，當癌症或是動脈硬化發生的時候，往往可以偵測到岩藻糖修飾的寡醣大量產生^(5, 6)；但若是在人體中缺乏岩藻糖，則可能會導致白血球病變 (Leukocyte adhesion deficiency type II, congenital disorder of glycosylation IIc)⁽⁷⁾。

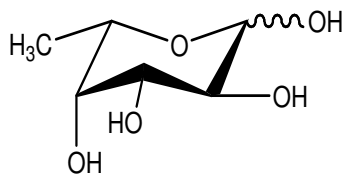



圖 1-1、L-fucose 糖基分子結構。

正常肝組織高。用系列凝集素分析發現這些糖鏈主要能結合伴刀豆凝集素 A，也能結合 E-型及 L-型植物凝集素，顯示這種糖蛋白的糖鏈可能含有較多的高岩藻糖型。這些結果提示糖鏈在誘癌過程中架構有了改變，使之在肝癌細胞的遷移和轉移中起重要作用。(e) 人類基因遺傳疾病，黏多醣症第二型---岩藻糖血症(Fucosidosis)^(2,11,12)：岩藻糖血症是一種溶小體代謝物異常堆積疾患，病人因缺乏岩藻糖苷酵素活性，導致含岩藻糖的糖脂及糖蛋白累積在不同組織中，引起漸進性精神及運動功能退化、生長遲緩及彌漫性體血管角質瘤。岩藻糖血症是一種極端罕見的體染色體隱性遺傳疾病，造成身材矮小，嚴重智能遲滯，並常出現呼吸道感染。病患從幼兒期起即出現粗糙臉部特徵，同時，從軀幹發生逐漸增加的彌漫性紫斑與紅色小丘疹，切片結果為血管角質瘤。此外，也發現病患的臉頰蒼白，指甲遠端有紫色橫紋，白血球中 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素活性非常低(0.5 $\mu\text{mol/g/hr}$)。



岩藻糖以醣蛋白及醣脂肪模式廣泛存在於身體，擔任細胞與細胞間之連絡，尤其是神經、腎小管、睪丸及皮膚；在癌症及糖尿病其組成更是有所改變。一種免疫系統缺乏症，叫做白血球黏合蛋白缺乏症，其主要是岩藻糖無法合成醣蛋白所致。它主要以尿液排泄，在懷孕晚期及哺乳期，尿液中增加，其表示是胎兒之晚期發育及母體轉移免疫力與嬰兒是需要岩藻糖結合物。含有 Lewis_X 抗原(在乳胺醣上第三位置連接有岩藻糖，屬於三糖)的醣脂質，通常在胎兒脊髓皮質神經細胞產生時，這種醣脂質產生的量達到最高值。此外，細胞表面的醣分子，第二位置是否有岩藻糖(也就是說， α -1,2-fucosylation)與神經細胞的分化，神經軸突的產生，有極密切的關係。 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素的基本生物功能，主要是催化各式各樣含岩藻糖基的低聚醣、醣脂肪、醣蛋白…等水解以及代謝。因此，其生理功能是一重要的研究課題。若能以化學合成的方法，製造分子來特別地標示出這些岩藻糖轉移酵素，以上所提的許多問題與關聯，將可以獲得直接的答案。

1-2、哺乳類動物 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素的概述

1-2-1、哺乳類動物之 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素介紹

α -L-岩藻糖水解糖苷酵素廣泛的存在於各種生物體中已被充分的證實。近 30 年來，學者們利用萃取的方式取得各種不同來源的 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素並對其性質進行深入的研究，見表 1-1。而在這一連串的研究中，除了釐清 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素的生理意義之外，更能促使醫學上發展出有效治療在 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素所發生相關的罕見遺傳性疾病 Fucosidosis^(13,14)、癌症與神經病變。經由序列比對中得知，哺乳類動物的 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素間具有較高的相似性，因此，這一類來源的岩藻糖水解糖苷酵素在性質上也就較為接近。早期的 Immunoprecipitation 的相關研究顯示，哺乳類動物的 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素具有類似的 Antigenic sites (epitopes)，即不同來源的哺乳類動物的岩藻糖水解糖苷酵素能夠與同一種抗體進行互動作用⁽¹⁵⁾；但是也有部分的抗體具有較高的專一性，無法與其他來源的 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素進行作用⁽¹⁶⁾。

表 1-1、哺乳類動物的 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素特性比較⁽²⁸⁾。

α -L-Fucosidase source	Whole enzyme M_r ($\times 1000$)	Subunit(s) M_r ($\times 1000$)	Number of isoforms	Presence and/or type of carbohydrate	Reference(s)
Human liver	175*	54, 59	8	Yes	Alhadeff <i>et al.</i> , 1975a
	230†	—	—	—	Alhadeff and Andrews-Smith, 1979b, 1980
Human brain	—	51, 57	4-5	Man, Glc, Gal GlcNAc, NANA	Kress <i>et al.</i> , 1980
	—	51	7	—	Alhadeff and Freeze, 1977
Human serum	296*	54, 56.5	6	—	Alhadeff and Janowsky, 1977
	390*	63	7	NANA	Hopfer <i>et al.</i> , 1990
Human placenta	50, 200*	—	4	—	Alhadeff and Janowsky, 1978
	305*	25, 51, 55	5	Man, GlcNAc Gal, NANA	DiCioccio <i>et al.</i> , 1982
Human spleen	50, 100*	50	—	Man, GlcNAc, NANA	DiMatteo <i>et al.</i> , 1976
Monkey brain	285*	73.5	6	—	Turner, 1979
Porcine thyroid	192‡	55	10	NANA	Chien and Dawson, 1980
Rat epididymis	210-220†	47, 60	1	Yes	Alam and Balasubramanian, 1978
	—	47-50	6	—	Grove and Serif, 1981
Rat liver	—	50, 57	—	—	Carlsen and Pierce, 1972
	160*, 217†	55	Multiple	Man, Gal, GlcNAc Glc, NANA, Fuc	Leray <i>et al.</i> , 1986
Mouse liver	300*	—	—	—	Jain <i>et al.</i> , 1977
Canine liver	90-150*	57, 63	Multiple	—	Wright <i>et al.</i> , 1976
	50*	45-50	—	—	Opheim and Touster, 1977
					Laury-Kleintop <i>et al.</i> , 1987
					Barker <i>et al.</i> , 1988

*Determined by gel filtration chromatography.

†Determined by sedimentation equilibrium analysis.

‡Determined by density gradient ultracentrifugation.

IEF (isoelectric focusing) 的研究上，證明了 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素具有各種不同的異構型式 (isoform)。若將 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素中加入神經胺酸進行反應，可以觀察到酸性異構型式的相對含量會降低而中性的部分則是增加；反之若將經過神經胺酸酶處理後的 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素與人類肝臟唾液酸轉移酵素 (sialyltransferase) 以及 CMP-N-acetylneuraminic acid 反應後則會使酸性異構型式再度產生，因此， α -L-岩藻糖水解糖苷酵素具有各種不同異構型式的成因很有可能是蛋白質經過不同程度的唾液酸 (sialic acid) 修飾所造成的，而人類血清中的 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素的唾液酸修飾較源自於肝臟中的 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素來的高⁽¹⁷⁾，老鼠的 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素也曾經被發現過具有唾液酸修飾的現象⁽¹⁸⁾。而唾液酸修飾在某些程度上也會影響蛋白質對某些特定抗體的專一性⁽¹⁹⁾，Alhadeff... 等人曾經發現具有唾液酸修飾後的人類肝臟 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素，對 goat anti-human liver α -L-fucosidase 抗體的作用較一般修飾較少的異構型式來得差。

α -L-岩藻糖水解糖苷酵素的特徵除了具有唾液酸修飾之外，通常還會有各種不同的糖基化現象。胞內與胞外的 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素具有不同程度的糖類修飾。早期的單糖組成分析的結果顯示， α -L-岩藻糖水解糖苷酵素也是糖蛋白的一種，其中糖苷的組成約占整個分子量的 7-8 %。而這些糖基化的修飾中，一類是屬於甘露寡糖 (oligomannoside) 為主的糖類修飾；另一種則屬於 N-乙醯基乳糖胺 (N-acetyl lactosamine) 的糖類修飾；最後一種則是混合型的寡糖修飾。而這些寡糖中可能具有甘露糖、葡萄糖、乳糖、岩藻糖等單糖分子。80 年代末期，由 Beem⁽²⁰⁾ 等人以及另一個研究團隊 Argad⁽²¹⁾ 等人利用氫原子核磁共振的技術，分析經由蛋白質酶所分解 (Pronase digestion) 處理過的人類肝臟 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素，其中可以觀測到 9 個甘露寡糖以及 6 個 N-乙醯基乳糖胺的糖類修飾，但沒有其他糖類的寡糖修飾；這個結果與後來 Fukushima⁽²²⁾ 等人以及 Aronson⁽²³⁾ 等人從基因序列上推測出一個 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素的單體可能具有至多四種糖基化修飾的結果大致符合。

雖然 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素的醣類修飾是否具有其他生理功能，還不是非常明確，但是部分關於醣類修飾的研究指出⁽²⁴⁾，缺少醣類修飾的 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素於酸性條件下催化水解反應時，通常活性可能會降低且穩定度也不如經過醣類修飾的，其催化特性可能會有些微的變動。因此，推測醣類修飾可能有助於 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素於溶酶體的酸性環境中穩定運作。

1-2-2、哺乳類動物之 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素動力學上的特質

α -L-岩藻糖水解糖苷酵素在生物體中，可以水解各式各樣含岩藻糖的醣類化合物。哺乳類動物的 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素通常對水解 α -1,2 鍵結至半乳糖上的岩藻糖具有較高的活性；對於 α -1,3、 α -1,4、 α -1,6 鍵結至 N-乙酰葡萄糖胺的岩藻糖反應性則是相對較弱。除了岩藻糖本身的鍵結位置會影響酵素的反應活性之外，岩藻糖鄰位上所鍵結的糖苷分子與反應受質的大小皆對酵素的反應活性有所影響^(25, 26)； α -L-岩藻糖水解糖苷酵素對較小的受質具有較佳的反應性⁽²⁷⁾。

通常 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素大多使用 p-nitrophenyl- α -L-fucopyranoside (pNPF) 或是 4-methylumbelliferyl- α -L-fucopyranoside (4-MU-fucoside) 為受質進行活性測試。針對這兩種不同的受質，於文獻中的數據整理顯示⁽²⁸⁾，見表 1-2，岩藻糖水解糖苷酵素活性最佳的 pH 範圍一般都位於 4.0-6.0 之間；此外，在 pH 6.0-7.0 之間也具有不錯的反應活性，是一種嗜酸性蛋白質。以受質 pNPF 為例，其 Michaelis constant 之 K_m 介於 0.1-1.3 mM 之間；Maximal velocity (V_{max}) 通常是 11-27 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ 。

表 1-2、哺乳類動物的 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素活性比較⁽²⁸⁾。

Table 2. Kinetic properties of purified mammalian α -L-fucosidases

α -L-Fucosidase source	V_{max} (μ mol/min/mg)		Michaelis constants (mM)		pH optima		Reference(s)
	PNP*	4-MU†	PNP*	4-MU†	PNP*	4-MU†	
Human liver	19.6	14.1	0.43	0.22	4.6 (6.5)‡	—	Alhadeff <i>et al.</i> , 1975a Robinson and Thorpe, 1974
	—	—	1.1	—	—	—	Kress <i>et al.</i> , 1980
	—	—	—	0.06	—	3.9–4.0 (6–7)	Alhadeff and Janowsky, 1977
Human brain: soluble pellet	10.7	—	0.44	—	4.7 (6.6)	4.7 (6.6)	Hopfer <i>et al.</i> , 1990
	—	—	—	0.07	—	5.5	Alhadeff and Janowsky, 1978
Human serum	—	—	0.52	—	4.8 (6.1)	—	DiCioccio <i>et al.</i> , 1982
	11.6	—	0.18	—	5.0	—	DiMatteo <i>et al.</i> , 1976
Human placenta	—	—	0.38	0.3	5.5	6.0	
Human spleen							
I	—	—	—	0.13	—	5.3	Chien and Dawson, 1980
II	—	—	—	0.06	—	5.0	
Monkey brain	15.2	—	0.22	—	5.0 (6.0)	—	Alam and Balasubramanian, 1978
I	—	—	—	—	5.0	—	Alam and Balasubramanian, 1979
II	—	—	—	—	4.0	—	
Porcine thyroid	—	—	—	—	5.1	—	Grove and Serif, 1981
Rat cerebral cortex	—	—	1.33	—	4.3	—	Bosmann and Hemsforth, 1971
Rat epididymis	—	—	—	—	6.3	—	Carlsen and Pierce, 1972
	—	—	0.27	—	—	—	Jain <i>et al.</i> , 1977
	—	—	0.19	—	5.7–5.9	—	Opheim and Touster, 1977
Rat liver	27.0	—	—	—	—	—	Laury-Kleintop <i>et al.</i> , 1987b
Mouse liver	—	—	—	0.05	—	5.5 (4.0)	Barker <i>et al.</i> , 1988
Canine liver	—	—	—	0.28	—	7 (5.5)	

*Determined using *p*-nitrophenyl- α -L-fucopyranoside.

†Determined using 4-methylumbelliferyl- α -L-fucopyranoside.

‡pH of shoulder of activity in parentheses.

1-2-3、人類 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素的介紹

α -L-岩藻糖水解糖苷酵素(α -L-Fucosidase)是一種溶酶體酸性水解酵素，廣泛存在於人體各組織細胞溶酶體和體液中，胎盤、胎兒組織、腦、肺、肝、胰、腎以及血清、尿液、唾液和淚液中均含有，是一種廣泛分佈於人體內的一種醣類水解酵素。

人類肝細胞組織之 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素由 439 個胺基酸所組成的醣蛋白，在人體內呈多形性，有三型同功酵素，即 Fuc_1、Fuc_2-1、Fuc_2，是由一個位於第 1 號染色體短臂(1, P34)上基因位點的兩個對偶基因(Fuc_1, Fuc_2)所表達，而 Fucosidosis 的患者通常還會具有第三個 silent 對偶基因⁽²⁹⁾Fuc_0。高活性的 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素由基因 Fuc_1 所表達，低活性的則由基因 Fuc_2 所決定；而 Fuc_2-1 則由兩個基因的雜合子所決定。各型同功酵素的活性不一，依序為 Fuc_1 > Fuc_2-1 > Fuc_2；因此，純合子型(Fuc_1, Fuc_2)表現為高活性或低活性的 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素，而雜合子(Fuc_2-1)表現為中等活性。由於各人所表達的同功酵素類型不同，所以正常人的 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素活性高低不一，大約有 10 %左右的 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素呈現低活性。

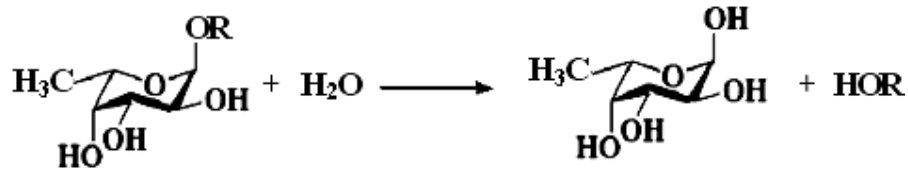
早期對此酵素的研究測定主要用於診斷遺傳性 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素缺乏症(Fucosidosis)⁽³⁰⁾，缺乏 α -L-岩藻糖糖苷水解酵素會造成含岩藻糖基的低聚糖、糖肽、糖蛋白和糖苷 這些物質從初生兒起就在組織中堆積，引起岩藻糖 苷貯積病 (neurovisceral storage disease)。有關於 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素基因研究指出，共有超過 26 種的突變情形可能會導致 Fucosidosis，其中有部份亦可能只是基因的多型性^(31, 32)。這些突變中最常見的為發生於胺基酸序列中第 422 個位置之鹼基密碼產生胞嘧啶(Cytosin)變為胸腺嘧啶(Thymine)的點突變，造成蛋白質序列轉譯提早停止，而使 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素活性失活。因此，對組織細胞、尿液和血清中 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素測定可協助該病的診斷，並藉以與其他遺傳性黏多糖貯積病鑑別。一般 Fucosidosis 的患者通常尿液中都有大量的 糖肽，而其中最常見的則是 glycoasparagine⁽³⁰⁾，這一類糖肽會大量的堆積，最有可能的原因是岩藻糖修飾後抑制了 glycoasparaginase 的分解，這是因為沒有岩藻糖水解糖苷酵素將岩藻糖水解移除，岩藻糖會產生立體阻礙使得 glycoasparagine 堆積；抑制的現象也受到岩藻糖鍵結位向的影響， α -1,6 鍵結的岩藻糖可能具有較小的立體阻礙，因為這些堆積的物質之中並沒有發現 α -1,6 鍵結的岩藻糖化合物^(33, 34)。

此外，亦有其他幾種疾病與 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素相關；在囊胞性纖維症 (cystic fibrosis) 患者中， α -L-岩藻糖水解糖苷酵素在細胞內與外均會有不正常的分佈^(35, 36)。80 年代法蘭西學者 Deugnier 等研究發現⁽³⁷⁾，原發性肝癌患者的血清 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素活性會升高，並被眾多研究所證實^(38, 39)，因此， α -L-岩藻糖水解糖苷酵素被作為肝癌的腫瘤標誌物(tumor marker)，並與 AFP (α -fetoprotein) 聯合參照應用則大大提升了診斷偵測價值^(38, 39)。 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素除了與肝癌具有相關性之外，關於直腸癌的研究也指出^(40, 41)，直腸癌的患者其 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素的活性也會有不正常的變化；根據部分研究指出，直腸癌患者的血清 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素活性會大幅下降約 50 %左右⁽⁴⁰⁾；另一方面， α -L-岩藻糖水解糖苷酵素的活性變化也可以用於判斷手術摘除腫瘤後復發以及患者恢復狀況的重要指標。由於 α -L-

岩藻糖水解糖苷酵素的活性在癌症患者身上具有明顯的變化，因此可以有效的應用於部分癌症的診斷以及評估^(40, 41)。

1-3、 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素(α -L-Fucosidase)之性質分類簡介

α -L-岩藻糖水解糖苷酵素是糖苷水解酵素(glycohydrolase)的一種，它可催化岩藻糖苷鍵之水解反應，如下：



其中 HOR 可為另一糖苷分子或醇類如烷基醇或苯酚類，具相當廣泛的受質特異性⁽⁴²⁾。

α -L-岩藻糖水解糖苷酵素(α -L-Fucosidase, α -L-Fucoside fucosidase)是由還原端水解一岩藻糖的外切型(exo)水解糖苷酵素，廣泛的分佈在自然界各式各樣的物種之中，如細菌^(43, 44)、黴菌⁽⁴⁵⁻⁴⁹⁾、軟體動物和哺乳動物等。由於自然界中醣類化合物的立體化學非常繁複，對應而來的是一個相同且具多樣性的糖類水解系統。根據 IUB 酵素命名法，醣類水解酵素屬於 E.C.3.2.1.X。前三個數字代表此類酵素催化糖苷鍵的水解反應機構，第四個數字則反映該酵素的受質⁽⁵⁰⁾，有時也反映其反應機構。但對醣類水解酵素而言，此分類法有其限制性。例如：對具寬廣受質特異性(broad substrate specificity)的酵素而言，此分類法便不合適。而且有時它並不足以、或無法反映出該酵素架構上的特徵。事實上，這種根據受質而提出的命名法也無法反映出各酵素來源之物種的演化情形。 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素屬於水解酵素(hydrolase)的一種(EC 3.)，催化水解岩藻糖中 C-O 之糖苷鍵結，屬於 O-糖苷水解酵素(O-glycoside hydrolases, EC 3.2.1.-)，針對多醣複合體進行水解催化作用，依其作用位置而釋放出

糖單體^(50,51)。根據酵素分解鍵結模式區分，L-岩藻糖水解糖苷酵素可分為 α 和 β 型式，分別水解 α -L-岩藻糖和 β -L-岩藻糖。由於組成糖苷化合物之岩藻糖彼此間亦具有不同碳跟碳之鍵結(如 α -L-1,2、 α -L-1,3、 α -L-1,4 和 α -L-1,6 等不同鍵結)，根據所衍生出不同鍵結結構位向的複合糖苷受質，酵素水解作用之位置亦產生具有不同專一性之蛋白質酵素。本實驗研究之人類肝組織 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素屬於水解型態酵素，其編號為 EC 3.2.1.51。其它依水解不同鍵結之 α -L-岩藻糖糖苷酵素，分別是 α -L-1,2 鍵結為 EC 3.2.1.63， α -L-1,3/1,4 鍵結為 EC 3.2.1.111 和 α -L-1,6 鍵結為 EC 3.2.1.127。

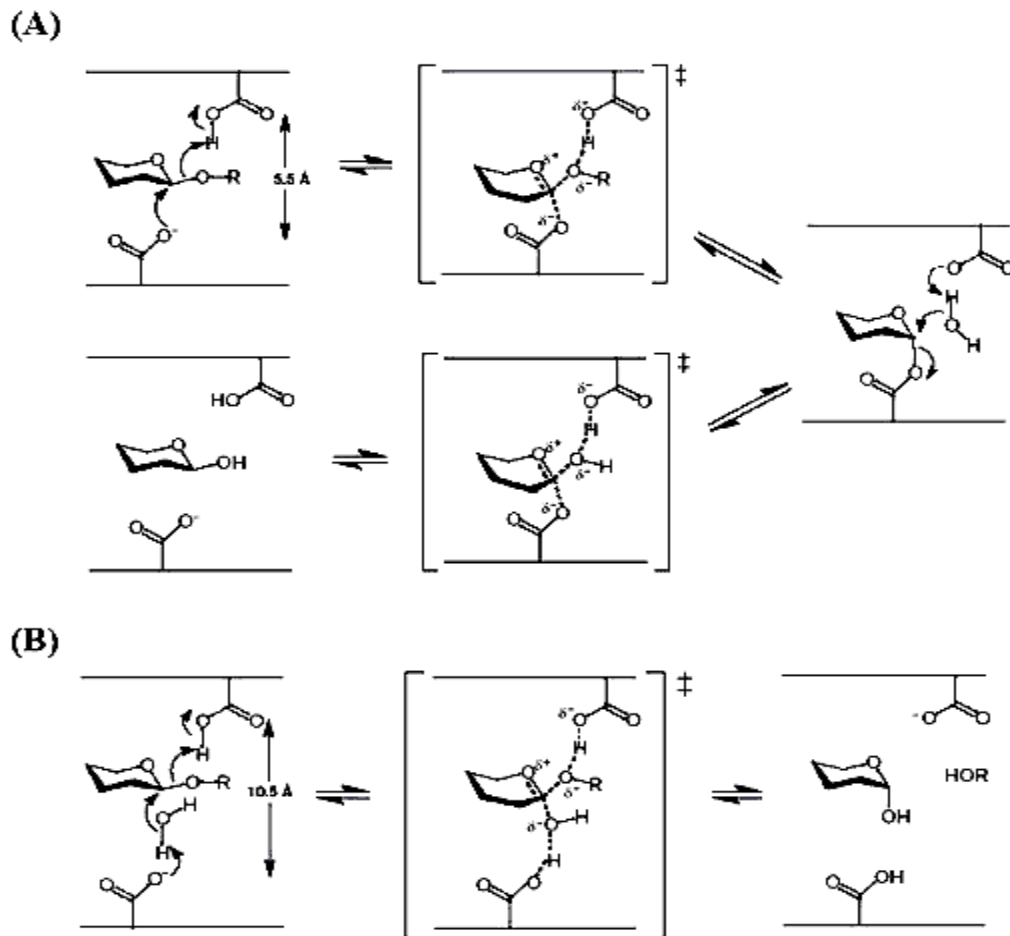
蛋白質胺基酸序列的相似性和其三維摺疊(fold)的相似性具有直接關係⁽⁵²⁾。隨著越來越多的糖類水解酵素序列被發表，序列比較(sequence comparison) 的方法也被應用在此類酵素上。由發表的文獻⁽⁵³⁾中可知，目前超過 2,000 種不同的糖類水解酵素，並依胺基酸相似度被分類為 115 個家族 (family) (可能隨時間改變)^(54,55)，此訊息可由 CAZy 資料庫(<http://afmb.cnrs-mrs.fr/~pedro/CAZY/db.html>)來提供，且超過 3,000 種以上不同來源的糖苷水解酵素之胺基酸序列已被解析。根據酵素架構與功能的關係，我們可以預測若幾個酵素被歸類在相同的家族中，表示他們有著相同的立體催化反應結果，亦即他們的晶體結構也可能具相似的摺疊模式。而在這 115 個糖苷水解酵素家族中， α -L-岩藻糖水解糖苷酵素(α -L-Fucosidase, α -L-Fucoside fucohydrolase)，這一類的糖苷水解酵素現已經分別被歸類於糖苷水解酵素第 29 家族 (CAZY GH-29) 與第 95 家族 (CAZY GH-95)，而兩家族之 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素的區別，分別在於酵素所催化水解的糖苷受質之鍵結結構位向和反應機制不同。家族 GH-29 為雙取代(S_N1 -like)的保留機制反應⁽⁵⁶⁾，而家族 GH-95 為單取代(S_N2 -like)的反轉催化機制⁽⁵⁷⁾。

到目前研究為止，對於糖苷水解酵素而言，一般認為其反應機構大致可區分為構形保留(retention configuration)及構形反轉(inverting configuration)兩種模式。兩種反應途徑都含有兩個主要催化羧酸基團(carboxylic acid residues)之活性位置⁽⁵⁸⁻⁶⁰⁾；其作用的機制可由圖 1-3 來表示說明：(A) 保留機制(Retention mechanism)：保留性糖

苷水解酵素(retaining glycoside hydrolases)進行催化作用時，利用雙取代機制導致異位性碳原子構型的保留，於第一步的糖基化作用(glycosylation)時，當作一般酸功能的羧基群(carboxylic group)催化離去基團(leaving group)離開的同時，亦伴隨著第二個羧基群進行親核性的攻擊，形成糖基-酵素的中间產物(glycosyl-enzyme intermediate)；在第二步的去糖基作用(deglycosylation)中，水分子被去質子化的羧酸基群(去質子酸)活化之後，進行第二波的親核性攻擊，水解糖基-酵素之中间產物，釋放留有原受質構型之水解產物，而此反應機製也常伴隨轉糖反應(transglycosylation)，兩催化羧基間之距離約在 5.5 Å 左右。(B) 反轉機制(Inversion mechanism)：反轉性糖苷水解酵素(inverting glycoside hydrolases)利用單取代機制將 β -糖苷鍵結架構型式的糖，水解形成還原端為 α -型式的糖苷分子(或 α -鍵結轉變成 β -型式)。當一活化的水分子對糖分子的一號碳(C1)進行親核性攻擊時，糖苷氧基發生質子化(protonation)的同時亦伴隨著配糖基(aglycone)的離開，整個催化反應過程為單取代反轉機制(single-displacement inverting mechanism)，造成反構體構型的反轉，形成相反的化學立體異構物。相較於保留機制，反轉機制為利於酵素順利進行催化水解反應，讓受質和當作親核性物質的水分子都能同時進到活化部位，因此在催化活性中心的兩羧酸基團(當作一般酸催化離去基團的離開和當作一般鹼協助水分子進行親核性攻擊)間之距離可介於 6.5 ~ 10.5 Å 之間，大於保留催化機制酵素的 5.5 Å^(42, 61, 62)。有關人類肝細胞組織 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素之反應機構將於後續章節中進一步討論。

雖然到目前 115 個家族中，只有約 70 個糖苷水解酵素家族的三維結構已被鑑定出，且它們的結構可方便地由 Protein Data Bank (PDB)得知，其中由結構而引人注目的問題是歧異度(diversity)，糖苷水解酵的歧異度可由 α -helix 及 β -sheet 的組成及排列差異表現出來，此結構歧異度不僅表示了酵素催化受質的歧異度，也代表了在演化上他們彼此的差異性，此明顯差異就是酵素提供與受質不同型式的穩定力量，這種力量主要貢獻在酵素反應活性中心與糖基鍵結位置上的穩定，亦即酵素穩定受質的過渡狀態複合體(包括各種引力的存在，如氫鍵為最常見到的例子)。藉由許多家族間具

有結構及機制之相關性者，允許人們將它們建構在相同的群性(clan)中，並以 GH-A、GH-B、.....、GH-N (GH：glycosylhydrolase) 等模式來分類命名。雖至今還尚未知 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素歸納其何結構群性中，但從已鑑定出的家族 GH-29 之 *Thermotoga maritime* α -L-岩藻糖水解糖苷酵素催化活化中心結構中發現為一 $(\beta/\alpha)_8$ 的構造；完整的晶體為一同型 dimer 的晶體構型，在正常細菌的生理活性為三個同型 dimer 所結合的酵素⁽⁶³⁾，見圖 1-4；而家族 GH-95 之 *Bifidobacterium bifidum* α -1,2- L-岩藻糖水解糖苷酵素為單一晶體構型，催化活化中心結構則為一 $(\alpha/\alpha)_6$ 的構造⁽⁶⁴⁾，見圖 1-5_A。



(圖來源自CAZy database：http://www.cazy.org/fam/ghf_INV_RET.html)

圖 1-3、糖苷水解酵素的反應催化機制示意圖。

(A) 保留機制 (Retention mechanism)，(B) 反轉機制 (Inversion mechanism)。

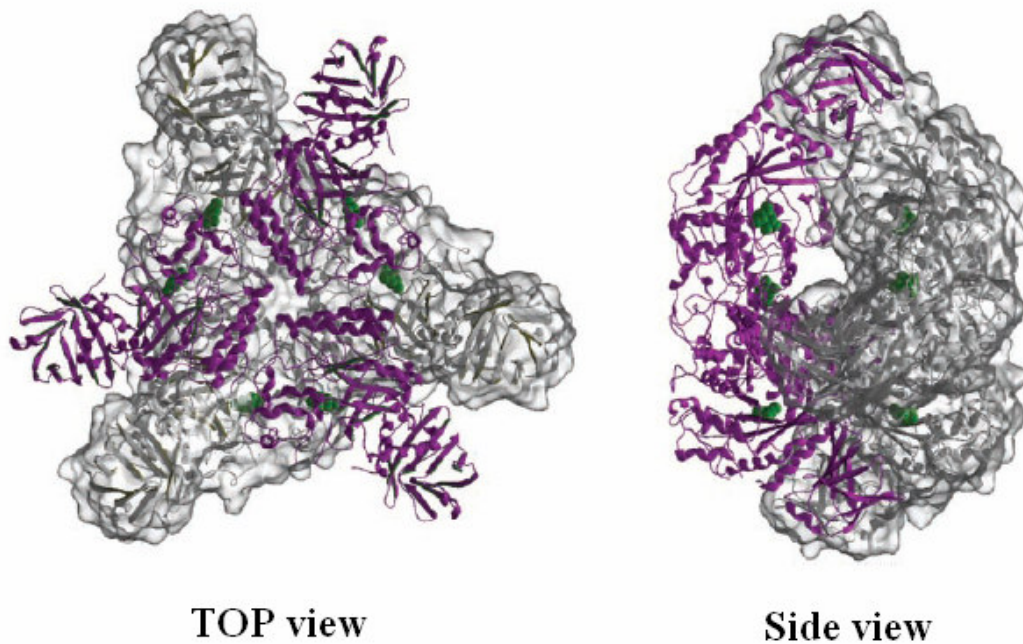


圖 1-4、家族 GH-29, *Thermotoga maritima* 之 α -L-岩藻糖水解酵素之 3-D 晶體結構⁽⁶³⁾。

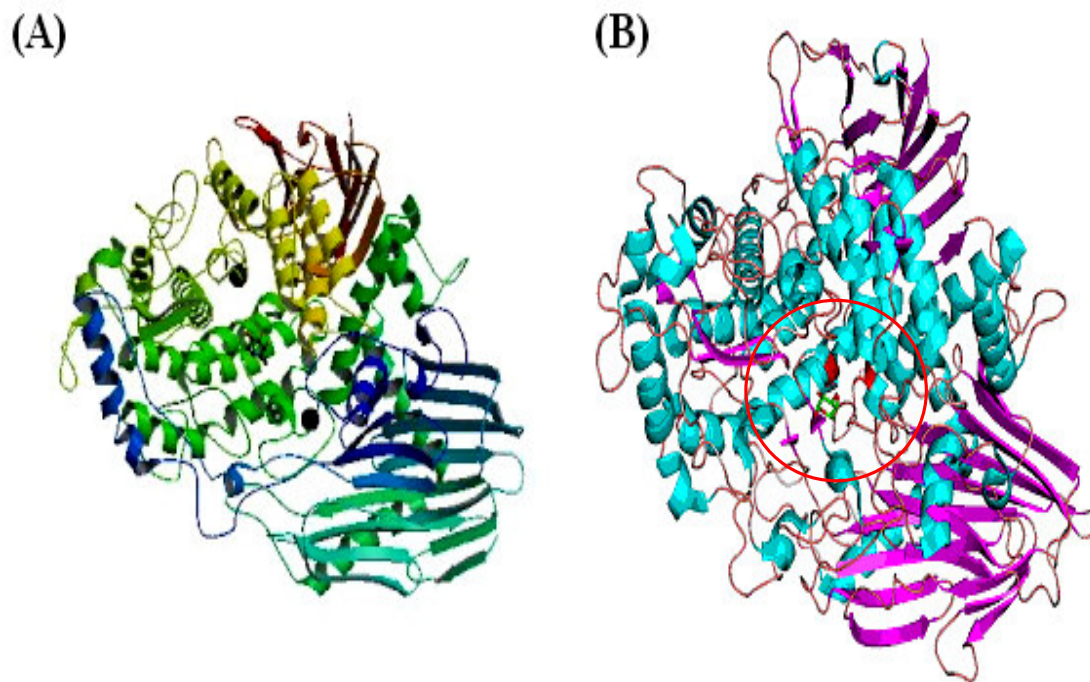


圖 1-5、家族 GH-95 *Bifidobacterium bifidum* 之 α -L-岩藻糖水解酵素之 3-D 晶體結構⁽⁶⁴⁾。

(A)為蛋白質晶體結構，(B)為岩藻糖-蛋白質複合體晶體結構。

1-4、 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素之研究

至今對 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素的相關酵素學(Enzymology)研究，分別有家族 GH-29 之 *Thermotoga maritima*、*Sulfolobus solfataricus* α -1,3(4)-L-岩藻糖水解糖苷酵素^(56,65,66)，在催化反應機制上為構形保留的糖苷水解酵素(retaining glycosidases)，是雙取代反應機構(double-displacement mechanism)；另一催化反應機制為構形反轉的酵素則為單步驟反應機構(single-step mechanism)，以家族 GH-95 之 *Bifidobacterium bifidum*、*Bacillus halodurans* α -1,2-L-岩藻糖水解糖苷酵素^(57,64,67)為主。我們將其研究資訊的已知結果歸納整理於表 1-3，可發現對 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素的研究對象仍以原核細菌為主，而在相同家族中，對真核生物之 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素相關酵素動力學研究皆有限。因此，在本論文將以家族 GH-29 之人類 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素進行深入的研究探討，並鑑定此糖苷水解酵素催化反應機制與何胺基酸扮演親核性(nucleophile)和一般酸/鹼(general acid/base)基團反應催化殘基？

表 1-3、 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素各家族之酵素催化機制、殘基與結構比較。

Glycoside hydrolase family	Mechanism	Catalytic Nucleophile/Base	Catalytic Proton Donor	3D structure status
GH-29	Retaining	Asp	Glu	(α/β) ₈
GH-95	Inverting	Asp	Glu	(α/α) ₆

在糖苷水解酵素研究文獻中，對於糖苷水解酵素家族之反應機制與重要催化殘基的鑑定方法、技術上，有著不錯的研究成果，從結果顯示藉由野生株(wild type)和突變株酵素(mutant enzyme)的催化反應速率、性質的改變⁽⁶⁸⁻⁷²⁾，並結合物理/有機化學法、酵素動力學、光譜分析法與蛋白質晶體結構…等，來探討扮演親核性和一般酸/鹼基團之胺基酸位置與催化活性上的重要性⁽⁷³⁾。我們將研究之方法歸納於下列：

(1) 蛋白質結構和胺基酸序列比對：從蛋白質-受質糖的複合蛋白質晶體結構，來判斷重要催化殘基胺基酸之位置是最為直接證明。對於 α -L-岩藻糖苷酵素的蛋白質晶體結構，已於各分屬家族之原核細菌解析完成，如：家族 GH-29 的 *T. maritime* α -L-岩藻糖水解除糖苷酵素(Tm-Fuc)，其結晶結構已於 2005 年經由 X-ray 繞射被解出⁽⁶³⁾，PDB 資料庫編碼為 1HL8, 1HL9, 1ODU；於另一家族 GH-95 的 *B. bifidum* α -1,2-L-岩藻糖水解除糖苷酵素(Bb-Fuc)，結晶結構則於 2007 年經由 X-ray 繞射已被解出⁽⁶⁴⁾，PDB 資料庫編碼為 2EAB、2EAC、2EAD。由於此兩家族之岩藻糖水解除糖苷酵素在催化反應機制各不相同。因此，兩家族岩藻糖苷酵素的蛋白質晶體中，所建構之催化活化中心結構，及扮演親核性基團與一般酸/鹼催化基團位置之二級結構亦有所差異；Tm-Fuc 酵素位於由 N-端蛋白序列起始中，以八個 β -平板結構所建構之桶狀區域催化中心的第 4 (親核性基團，Asp²²⁴) 與第 6 (一般酸/鹼催化基團，Glu²⁶⁶) β -平板結構上 (見圖 1-6)，而 Bb-Fuc 酵素則位於由 N-端蛋白序列起始中，以六個 α -螺旋結構所建構之桶狀區域催化中心的 α -螺旋結構上(親核性基團，Asp⁷⁶⁶ 與一般酸/鹼催化基團，Glu⁵⁶⁶；見圖 1-5_B)。

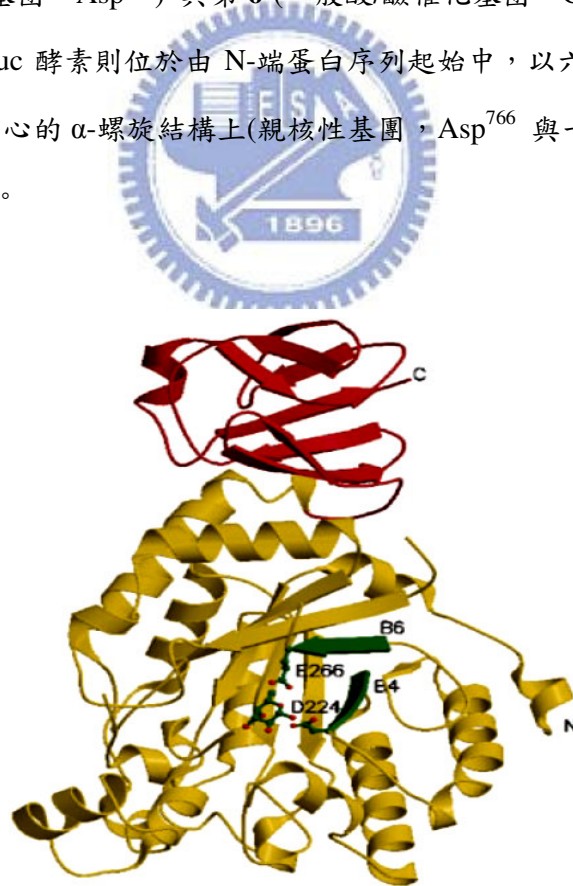


圖 1-6、家族 GH-29，*T. maritime* 之岩藻糖-蛋白質酵素複合體晶體結構⁽⁶³⁾。

將相同家族的糖苷水解酵素基因群，作胺基酸序列比對後⁽⁷⁴⁾，選出高度保留之胺基酸點及可能的催化殘基胺基酸 Asp、Glu 位置，以定點突變的方式產生此位置突變株酵素，針對此位置突變株的催化活性跟野生株相比，活性之反應速率值(k_{cat})分析至少降低 1,000 倍以上，由此推測，可能為扮演重要催化殘基胺基酸。

(2) 活性位置(active site)之滴定⁽⁷⁵⁾：使用催化活性中心位置不可逆抑制劑標的作用與二次質譜的定位作用 (active site affinity labelling and tandem mass spectrometric localization)：此方法為最直接證明活性中心親核性胺基酸及一般酸鹼催化胺基酸之殘基所在。此法是由輻射線標地的失活劑加以改良而來的，此原理是先從反應機制上找一個專一性高的不可逆抑制劑(失活劑)。一般而言，糖類水解酵素的失活劑種類很多，可依照相同水解家族 (group-specific labels)、反應機制 (mechanism-based inhibitors)及過渡狀態複合體類似物 (transitional complex analogue) 來區分，通常失活劑可為受質的修飾物或衍生物，而糖類水解酵素的受質又可在糖基鍵結(glycone moiety)及非糖基鍵結(aglycone moiety)兩個部位上做修飾物或衍生。一般糖類水解酵素常用的失活劑，其結構列於圖 1-7。

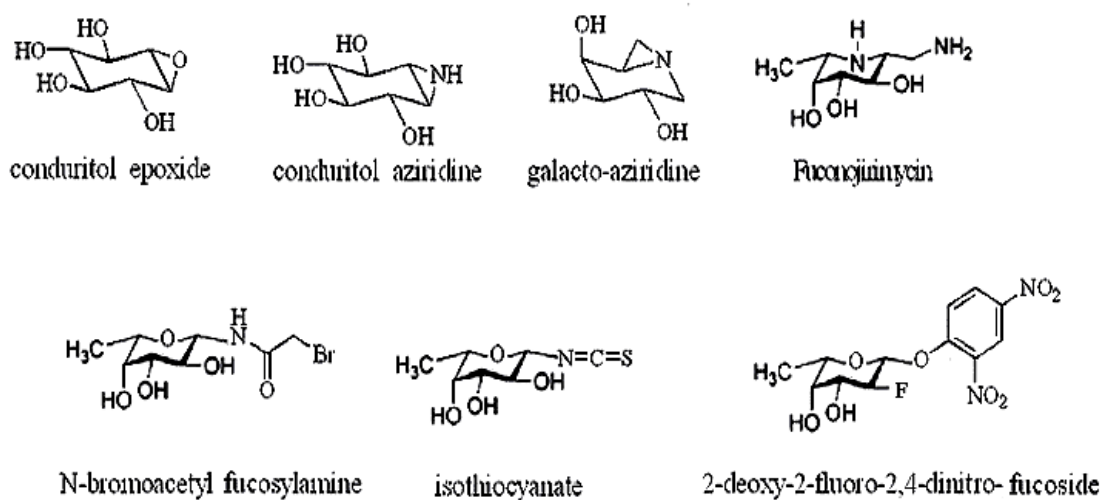


圖 1-7、糖類水解酵素常用的失活劑結構圖。

不管於何部位做修飾或衍生，失活劑的尋找要件為下述兩點：(1) 此失活劑要能與目標酵素具有專一特異性，即此失活劑僅跟活性中心的親核性胺基酸作用，而不與活性中心以外的胺基酸作用，(2) 作用後必須能與目標酵素結合成一穩定的共價鍵結物，而不被快速水解。利用抑制劑鍵結型態(inhibitor binding)之酵素動力學分析實驗，求得抑制速率常數 (k_i)、抑制常數 (K_i) 及復活速率常數 ($k_{react.}$)，將這些數值與野生株酵素作比較、或以質譜儀、光譜儀如 $^1\text{H-NMR}$...等分析反應後的共價鍵結物。此原理方法運用，以 Withers...等人對 *T. maritime* α -L-岩藻糖水水解糖苷酵素 (Tm-Fuc) 的研究最具代表，將 1,2(cis)-difluoro- α -L-fucopyranoside 之反應受質類似物抑制劑與 Tm-Fuc 反應使之失活後，產生酵素-反應物中間體的短暫累積，藉由胜肽圖譜(peptide mapping)定序後，可把標示的胺基酸鑑定出來；並可加入復活配子(reactivation ligands) 得到抑制速率常數(k_i)、抑制常數(K_i)及復活速率常數 ($k_{react.}$)⁽⁷⁶⁾，比較這些動力學數值與胜肽圖譜定序結果，推斷 Tm-Fuc 酵素中，突變株 Asp224Gly 彼此於活性位置空間上差異有多少也證明 Asp²²⁴ 此位置是親核性基團之所在^(56,63)，此流程的描述可用圖 1-8 之示意圖表示。

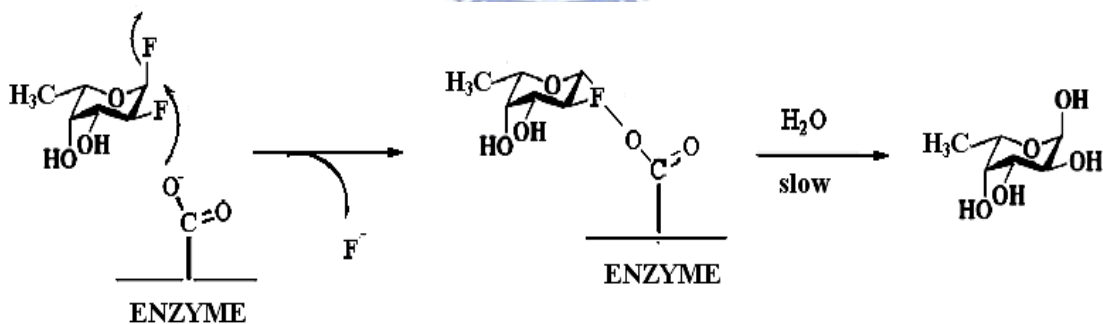


圖 1-8、Tm-Fuc 之 Asp²²⁴ 突變株酵素與失活劑之反應示意圖。

於找到適合失活劑之後，將適量的失活劑與酵素反應一段時間，待酵素行完全的失活反應，此反應液即為標示化的酵素，將此反應液以蛋白質水解酵素如 papain、pepsin 等行消化水解反應(enzymatic digestion)後，可得到一群胜肽的混合物，

將此混合物及未標示的胜肽(對照組)流經逆向式液相管柱層析儀(RP-HPLC)，得兩張層析圖，將此兩張圖做胜肽圖譜(peptide mapping)比對後，就可把已有標示的胜肽純化及鑑定出來。鑑定出來有標示的胜肽，仍可做胜肽定序鑑定或再以電子噴灑離子化串聯質譜儀(ESI-MS/MS)⁽⁷⁷⁾，以確定標示物是與酵素活性位置中的親核性胺基酸做共價鍵結，其流程見圖 1-9。此方法的優點為快速、靈敏、不需使用含輻射標地物，而其功能又能達到如含輻射標地物的使用要求。

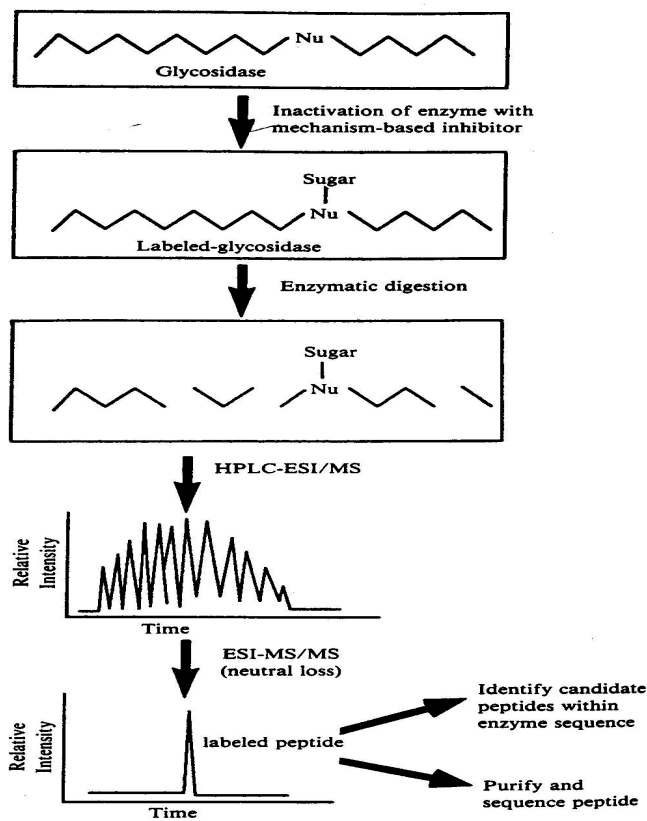


圖 1-9、親和性標示物與串聯質譜的定位流程圖。

(3) 典型動力學分析⁽⁷⁸⁾：熱穩定分析(thermal stability)、酸鹼度對活性的分析(pH-dependence)、結構與活性的研究(structure/reactivity studies) 及二級同位素效應分析(secondary deuterium kinetic isotope effects)來判斷野生株與重要殘基之突變株的反應機制差異。

(a) 由圓二色性光譜儀對蛋白質熱穩定分析，在一電場矢量方向按順時針方向旋轉的，稱為右圓偏振光；電場矢量方向按逆時針方向旋轉的，稱為左圓偏振光。而圓二色性(circular dichroism, CD)光學活性分子對左、右圓偏振光的吸收也不同，使左、右圓偏振光透過後變成橢圓偏振光，這種現象稱為圓二色性，而以 L-型式氨基酸所組成之蛋白質，在結構大致有三種： α -helix、 β -sheet、unordered，此三結構於 CD 光譜下，在 190~250 nm 吸收下有不同之 θ 值（見圖 1-10），藉此判定野生株、突變株酵素之蛋白質結構對催化活性的改變影響。

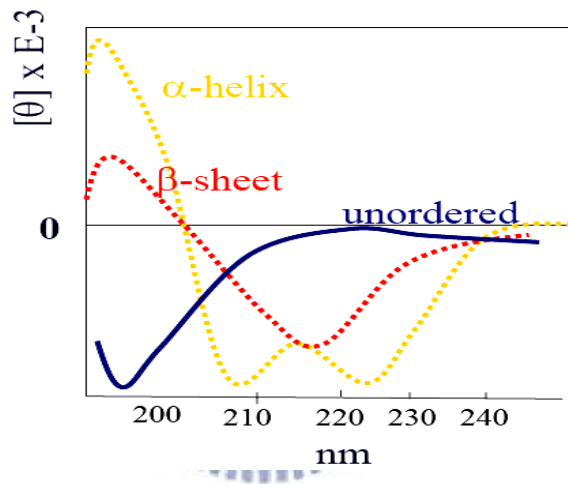


圖 1-10、CD 光譜中，蛋白質二級結構在各波長吸收下之 θ 變化值。

(b) 酸鹼度對活性的分析(由 $\log k_{cat}$ 與 pH 作圖)：在醣苷水解酵素(Glycoside hydrolase)上，pH-profile 呈現對稱鐘型曲線(bell-shaped curve)的趨勢，表酵素活性由兩個 pKa (apparent pKa) 操控，分別代表扮演親核性基團與一般酸鹼催化基團。在許多雙取代保留催化機制酵素的研究中，利用野生株與突變株酵素兩者在第二段的解離常數(pKa₂)的改變，因親核性基團突變過後造成親和性基團與一般酸催化的酸基團距離更遠了約 1Å (兩者的吸引力變弱)，這使得酵素與受質的複合體之幾合形狀改變了，而造成 pKa₂ 下降，此兩個 pKa 反應顯示出兩個胺基酸殘基在催化過程中扮演重要角色。

(c) 結構與活性二級同位素效應的研究 : 由二級同位素效應 (secondary deuterium kinetic isotope effect) 研究可知酵素催化反應之可能的過渡狀態體結構。利用突變株之 Brønsted plot ($\log k_{\text{cat}}$ 對離去基離去的難易度作圖) 與野生株酵素對各不同離去基之受質的催化, 其 k_{cat} 、 K_m 值比野生株酵素降低 $10^3 \sim 10^4$ 倍, 鑑定出可能為催化殘基的突變株酵素。

(4) 研究醣苷水解酵素反應機構的另一個重點, 即是鑑定哪一個胺基酸側鏈進行扮演一般酸/鹼反應 (general acid/base), 過去對家族 GH-29 殘基鑑定探討的 Withers 和 Antonio Trincone 等研究者, 分別針對 *T. maritima* 與 *S. solfataricus* 進行研究^(56,65,66)。而在鑑定扮演一般酸/鹼催化的胺基酸方法上, 主要有下列: (1) 由家族成員中作胺基酸序列比對後, 得知酵素催化作用所扮演一般酸/鹼反應胺基酸殘基, 於家族的基因群中皆高度保留。(2) 詳細的 pre-steady-state 和 steady-state 的動力學, 反應速率值 (K_m 、 k_{cat}) 分析⁽⁷¹⁾。(3) 突變株酵素在 pH 3.0~8.0 之間的活性 (pH dependence) 沒有很大的變化。(4) 突變株酵素對於好的受質而言, 因為不需質子協助催化, 其 k_{cat}/K_m 及 fucosylation step 速率常數值皆和野生株酵素相近; 但對於不好的受質而言, 極需質子協助催化, 其 k_{cat}/K_m 及 fucosylation step 速率常數值會比野生株酵素低 $10^3 \sim 10^5$ 倍。(5) 藉由化學活性復活法⁽⁷⁹⁾, 以增加酵素水解速率 (defucosylation step), 當加入具親核性的陰離子和功能性酸根試劑, 如: 疊氮 (azide)、甲酸根 (formate) … 等, 作為競爭型親核劑, 對於好的受質 (其速率決定步驟是 defucosylation step) 可以增加 k_{cat} 值 30-300 倍; 且藉加入疊氮 親核性 陰離子 攻擊於糖-酵素中間體, 可得到 α -fucosyl_azide 產物, 其作用產物可由 $^1\text{H-NMR}$ 鑑定之。由圖 1-11 可以瞭解將扮演親核性基團的胺基酸突變, 加入疊氮反應可以得到 β -fucosyl_azide 複合體的糖基產物; 而將作為一般酸/鹼催化的胺基酸突變, 會得到 α -fucosyl_azide。(6) 以雙步驟機制催化的酵素而言, 皆要有一般酸/鹼催化胺基酸來幫助催化水解反應⁽⁸⁰⁾, 若將此胺基酸突變後, 必降低此第二步驟的催化速率常數, 可降低此值至野生株的 1/450 以上。

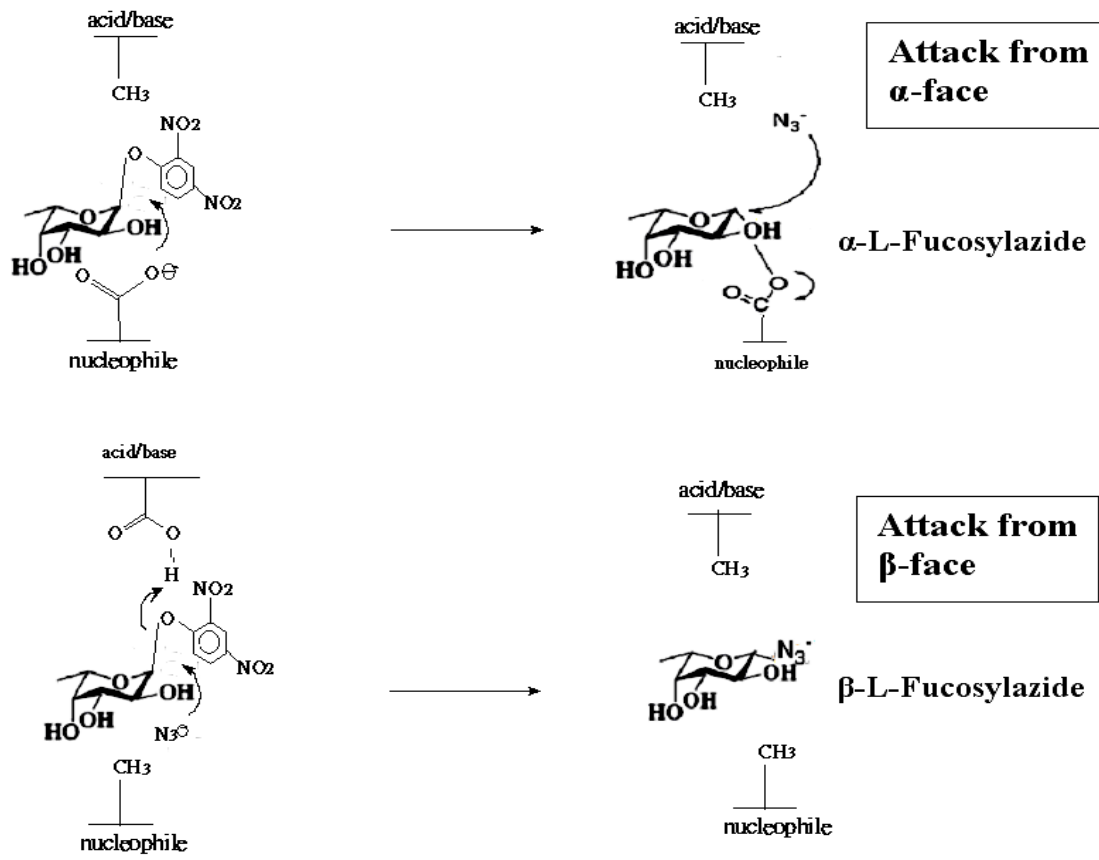


圖 1-11、為 *h*-Fuc 酵素之化學活性復活方法(rescure)的機制圖。

綜合歸納近幾年來，探討保留構型機制的醣苷水解酵素活性中心之催化重要殘基與作用機理性質，有幾種不同的證明模式方法。除了利用以反應機制及過渡狀態複合體類似物不可逆的抑制劑對酵素⁽⁸¹⁾進行標定之外，還有透過蛋白質-受質的複合晶體結構或是比對胺基酸序列尋找出保留的胺基酸殘基進行定點突變並結合化學活性救回…等模式⁽⁶⁶⁾。雖然早期已有文獻，以利用多種萃取純化方式，取得各種不同來源的 α -L-岩藻糖水水解醣苷酵素^(82,83)，但是這些不同來源的 α -L-岩藻糖水水解醣苷酵素，絕大數於酵素之催化特性、機制與蛋白質結構仍未詳盡，因此，這部分的工作仍有待後續努力完成使整個醣類水解酵素的研究更趨於完善。

1-5、論文研究動機

酵素可謂是一有機合成反應中催化劑的扮演者，增加反應的速率與專一性；而在酵素學的研究上，對醣苷水解酵素的催化反應機制與重要催化殘基基團的鑑定更是一重要研究課題。多年來對酵素的重要催化殘基鑑定上，發現帶有羧酸或帶有硫氫、氫氧基團的胺基酸是參與，和受質催化反應的重要角色。往往利用酵素活性中心結構，以抑制活性之化學物質，諸如催化受質類似物、碳二醯胺(carbodiimide)或汞化合物來與特定的催化胺基酸反應形成共價鍵結體，藉此鑑定參與催化反應的胺基酸類型^(84, 85)。然而長久在醣類水解酵素反應研究上，發現扮演催化殘基是以帶有羧酸的胺基酸殘基為主，且透過保留或反轉兩構型的機制進行水解反應^(84, 85)。醣苷水解酵素第 29 家族的雙取代保留構型反應機制，已於 1987 年 White... 等人從人類肝臟所純化之 α -L-岩藻糖水解醣苷酵素⁽⁸⁶⁾和其他研究團隊取得不同來源的 α -L-岩藻糖水解醣苷酵素^(65,66,82,83)，獲得證實。對反應為保留構型機制的醣苷水解酵素而言，在催化活性中心內具有兩個含羧酸基團(carboxylate group, $-\text{COO}^-$)的胺基酸，並透過兩步驟雙取代的模式進行催化反應，所得到的糖產物具有與受質相同的異位性中心架構；在這兩個不同步驟的過度態時，都可能會有 oxocarbenium ion 的架構產生^(87,88)，反應中間態的架構則是產生 β -L-岩藻糖-酵素鍵結中間複合體(β -L-fucosyl_enzyme intermediate)，如圖 1-12 所示。

源自於人類細胞、組織選殖之 α -L-岩藻糖水解醣苷酵素中，主要有兩個活性來源，分別為人體肝細胞組織(Fuc_1, 461個胺基酸)與血液漿細胞(Fuc_2, 467個胺基酸)，兩水解酵素之胺基酸序列彼此僅為68 % homology，但以人體肝細胞組織之 α -L-岩藻糖水解醣苷酵素為目前多數學者所研究。人類肝細胞組織之 α -L-岩藻糖水解醣苷酵素(Fuc_1, α -L-Fucosidase_1, EC 3.2.1.51)是一種外切型醣苷水解酵素，依胺基酸序列與催化機制分析 被歸於醣苷水解酵素第 29 家族(CAZY GH-29)中。在家族

GH-29 中， α -L-岩藻糖水解糖苷酵素是此單一種類之酵素，2005年更從原核生物 *T. maritima* 中，以X-射線繞射解析出此家族 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素第一個晶體結構。

由於歸屬在同一家族的糖苷水解酵素，主要在胺基酸的序列具有很高的相似性，而這類酵素的摺疊模式、立體架構、反應活性中心、反應機制和對受質的專一性…等性質，具有某種程度上的類似⁽⁸⁷⁾。因此，我們嘗試以Tm-Fuc為研究基礎，首先將Tm-Fuc與*h*-Fuc兩酵素，進行一級胺基酸序列的比對分析，結果顯示兩酵素序列之間只有著 34 % identity和 38 % homology。再者，利用 Insight II package program (MSI, San Diego, CA, USA) 分子結構模擬程式網站 (Swiss-Model server, <http://swissmodel.expasy.org/>)，建立*h*-Fuc酵素之3D-CPH model模擬結構(結果見圖1-13所示)，發現*h*-Fuc酵素的序列區域之結構模擬與Tm-Fuc酵素晶體結構極為相近，包括蛋白質序列由 N端起始所形成的 $(\alpha/\beta)_8$ (又名 TIM-barrel-like)和至C端終止所形成 β -sandwich like之兩區域折疊結構。將蛋白質一、二級序列比對與結構模擬結果彼此結合作為研究基礎，找尋*h*-Fuc位於活化中心，可能扮演重要催化殘基的Asp或Glu之位置，並配合酵素的定點突變、與合成各類不同芳香族離去基團之糖苷受質與酵素反應的Brønsted plot關係圖…等，鑑定人類組織 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素之催化機制、速率決定步驟與催化殘基位置。

本論文的研究課題與動機將分成以下幾點說明：(1) 利用 DNA 分子生物剪接技術，將人體肝細胞組織之 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素(α -L-fucosidase)的基因，建構於大腸桿菌的表現系統並配合蛋白質純化的技術取得高純度的酵素，以鑑定酵素的各種性質，(2) 取得相關的酵素動力學反應與¹H-NMR 光譜實驗數據，藉以判斷酵素反應機制與速率決定步驟，(3) 鑑定出人體 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素催化反應中，扮演親核性基團(nucleophilic attack)之胺基酸，(4) 鑑定出人體 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素催化反應中，扮演一般酸/鹼催化(general acid/base)之胺基酸。這些結果將詳述於第三章節-結果與討論。

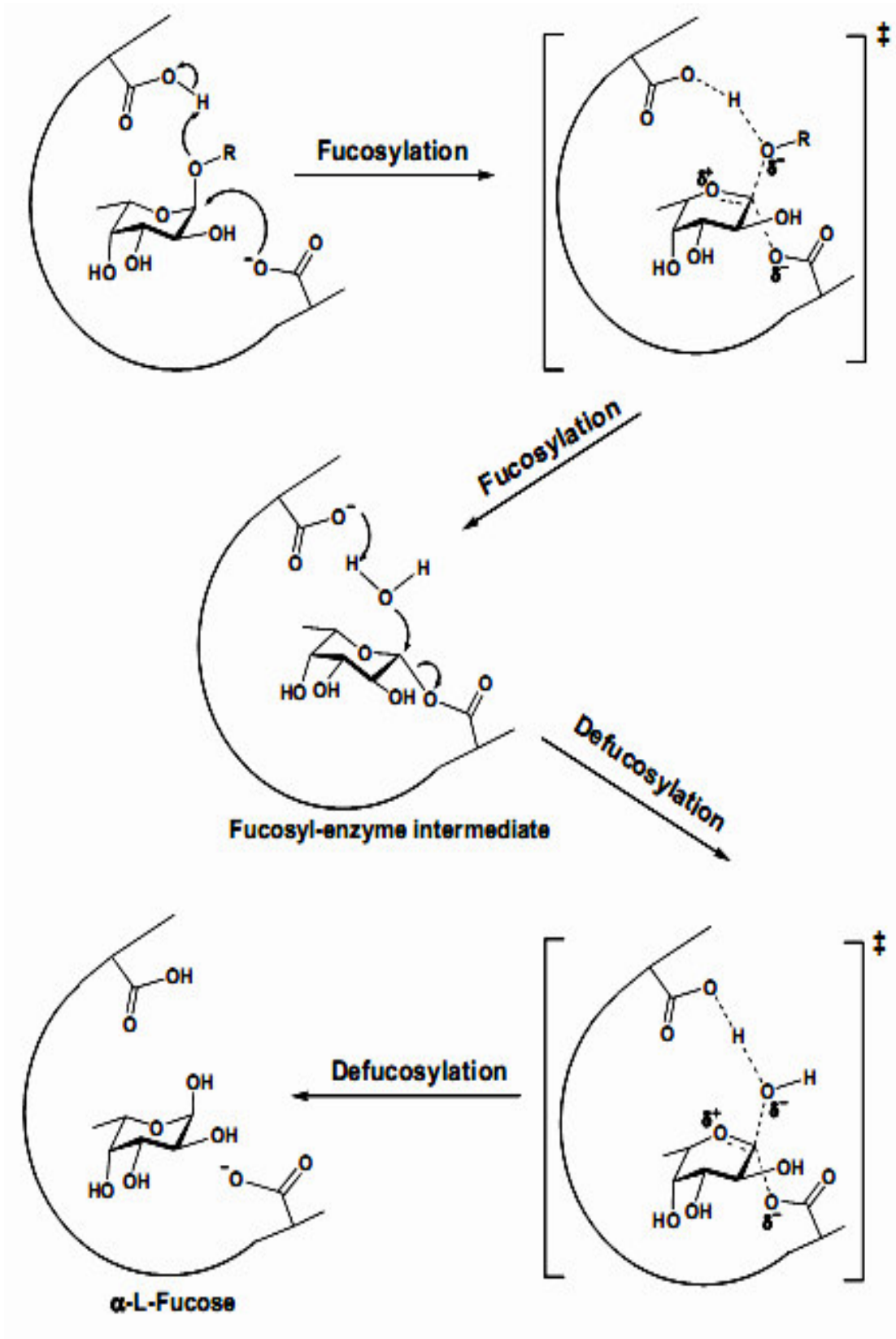


圖 1-12、 α -L-岩藻糖水解釋糖苷酵素反應機制推測以及過渡態架構。

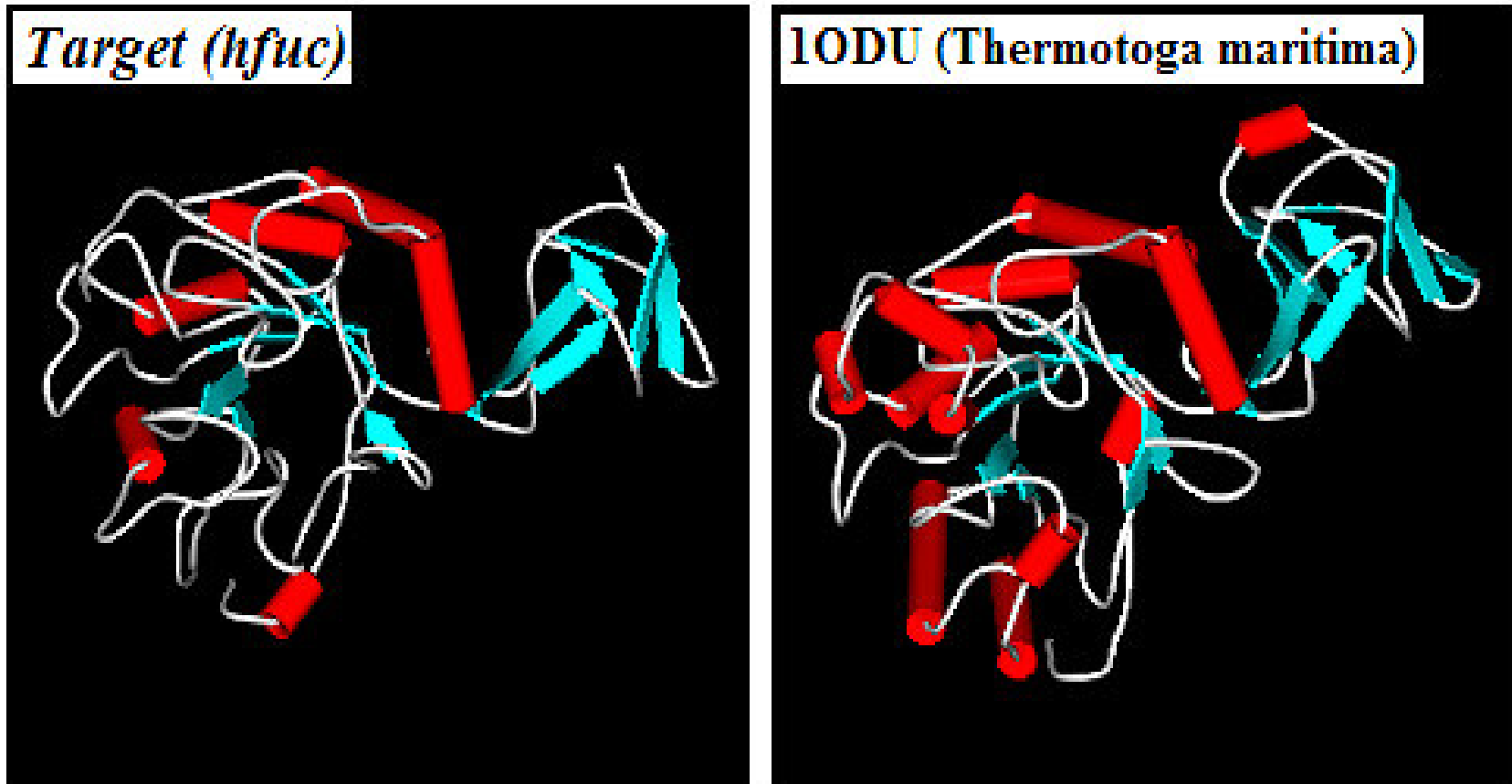


圖1-13、人類 α -L-岩藻糖水解酵素蛋白質之3D-CPH model模擬結構。

左圖、為以軟體模擬出本實驗 α -L-人類岩藻糖水解酵素之3D結構。

右圖、為 *T. maritima* α -L-岩藻糖水解糖苷酵素之3-D結構 (PDB 編號: 1ODU)。

第二章 實驗方法

2-1、藥品器材與儀器

1. 藥品：

菌種培養液藥品(Tryptone、yeast extract)購自 Merck、Difco 公司。

活性測試及緩衝溶液配製藥品購自 Merck、Aldrich、TCI、Sigma。

各式 Kit (T_A cloning Kit、PCR extract、Gel extract、Plasmid extract Kit、T4 ligase Kit)

購自 GeneMark、Viogene、NEB。

含 human α -L-fucosidase 基因之 pCMV 質體購自於 Stratagene。

2. 儀器：

恆溫培養箱 (EYELA NDO-450ND)

搖動培養箱 (RISEN refrigerated circulators、

FIRSTEK SCIENTIFIC B602D, S300R, S302R)

UV 吸收光譜儀 (Agilent 8453)

高速離心機 (KUBOTA 7700)

電子噴灑式串聯質譜儀 ESI-Q-TOF (Micromass)

真空濃縮機 EYELA rotary vacuum evaporator N-N series

超音波震盪儀 Misonix, ultrasonic processor

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

PC808 Program temp control system)

3. FPLC system (Pharmacia Biotech FPLC3467)

層析管柱：HiTrap Desalting column (Pharmacia, 5 mL)、HiTrap SP column、HiTrap

Q column、G-75 column、HisTrapTM HP 皆自 Pharmacia。

分液收集器 (ISCO、Pharmacia Biotech FRAC-100)。

4. Human α -L-fucosidase 之不可逆抑制劑: EPFP，由中研院林俊宏老師提供。

2-2、基因來源

含有人類 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素 (*h-Fuc*) 基因之 pCMV 質體購自於 Stratagene，此人類岩藻糖水解糖苷酵素基因來源為人體肝臟細胞組織中，所建構選殖至 pCMV 選殖載體的 cDNA 資料庫菌株之一。

2-3、勝任細胞(competent cell)的製備

製備 TSS 溶液(LB / 10% PEG₈₀₀₀ / 5% DMSO / 20 mM MgSO₄)和 5X KCM 溶液 (0.5 M KCl / 0.15 M CaCl₂ / 0.25 mM MgCl₂)，以 121 °C 滅菌 20 分鐘。取 1 ml 隔夜大腸桿菌(*Escherichia coli*)培養液，加入 100 ml LB 中，以 37 °C、150 rpm 培養至 OD₆₀₀ 為 0.4 (約 2~3 小時)。

將菌液，冰浴 20 分鐘，後在 4 °C 以 350 g (約 1,800 rpm)離心 8 分鐘以離下菌體，(不可離心過久，以免菌體附著管壁太緊)，迅速除去上清液，(菌體不可過多，否則轉型效率會不好)，以 20 ml 冰的無菌水清洗菌體，在 4 °C 以 350 g 離心 8 分鐘以離下菌體，除去上清液。用 1 ml 冰的 TSS 溶液溶解菌體，將欲分裝之離心管置於 -80 °C 冷凍 15 分鐘，取 100 μ l 分裝在離心管，使急速冷凍後，置於 -80 °C 保存。

2-4、轉型勝任細胞(transformation)

取出勝任細胞並於冰浴下溶解。將 10 μ l 以純化管柱處理過的質體 DNA，加入 20 μ l 5X KCM 溶液和 50 μ l 無菌水混勻後，以 heat shock 方式加入 100 μ l 大腸桿菌 JM-109 勝任細胞中混勻，冰浴 20 分鐘，置於 42 °C 下 60 秒，後放置室溫 20 分鐘。後再加入 50 μ l LB，置於 37 °C 以 200 rpm 培養 1 小時。將 100 μ l 分別各取 50 μ l 菌液塗在培養皿上(LB-Amp)，置於 37 °C 培養 20 小時。

最後，由 LB-Amp 洋菜基培養皿上點選單菌落，用 LB-Amp 培養液以 37 °C，150 rpm 培養 16 小時。取 3~5 ml 菌液，利用質體抽取管柱純化出乾淨的質體作為定序(cycle sequencing)的模版。此模板最後溶於 40 µl 無菌水之中。

2-5、人類 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素的基因重組與定點突變

2-5-1、基因的放大

由設計的寡核苷酸模板進行 PCR 反應，放大 pCMV 質體中，所含之人類 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素(*h-Fuc*)基因：

1. 利用質體抽取管柱，抽取含有 *h-Fuc* 基因之質體 pCMV。
2. 利用設計的寡核苷酸引子，包含 Nde I 和 Hind III 限制酶水解序列 HAFUh：
5'-CTGCAGCACATATGGTGCCTCGGGCCCAGCCTC-3' 和 HAFUt：
5'-AAGCTTGGATCCTCACTTCACTCCTGTCAGCT-3'，將所有下列比例藥品，加入 250 µl 微量離心管：
 - (1) human α -L-fucosidase (*h-Fuc*)基因之 pCMV 質體：3.5 µl
 - (2) 10X reaction buffer：5 µl
 - (3) 寡核苷酸引子 HAFUh (125 ng/µl)：1.5 µl
寡核苷酸引子 HAFUt (125 ng/µl)：1.5 µl
 - (3) 10 mM 的 dNTP mix：1 µl
 - (4) 加入 ddH₂O 使最後體積：50 µl
 - (5) 加入 1 µl 之 *vent* DNA 聚合酵素(2.5 U/µl)。
3. 進行梯度 PCR 反應

區間	次數	溫度	時間
1	1	95 °C	2 min
2	20	95 °C	30 sec
		55 °C	35 sec
		69 °C	1 min/kb (<i>vent</i>)
3	1	69 °C	1 min
	1	4 °C	30 min

4. PCR 完成後，取 5 μ l 進行 DNA 電泳分析，以確定產物的大小，之後利用 PCR 純化管柱，進行純化與回收。



2-5-2、人類 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素基因與表現載體 pET22b(+) 的接合(ligation)

1. pET22b(+)表現載體(環狀，完整之載體圖譜見附錄 I)以 Nde I 和 Hind III 限制酶水解成兩段線性 DNA，並利用 DNA 膠回收純化管柱，回收約 5,300bp 片段。
2. 將利用 PCR 純化管柱，所進行回收之 *h*-Fuc 放大基因，同樣以 Nde I 和 Hind III 限制酶水解，並利用 DNA 膠回收純化管柱，回收約 1,400bp 之 *h*-Fuc 基因片段。
3. 將步驟 1.和 2.所得之載體和人造基因片段以 1:5 比例混合，加入 1 μ l 的 T4 DNA 接合酶(ligase)與 1 μ l 的接合酶反應液(ligase buffer)，最後以 ddH₂O 加至總體積為 10 μ l，置於 16 °C 水浴中 24 小時進行接合反應。
4. 將剪接好的質體，轉型進入大腸桿菌 JM-109 培養其步驟與 2-4 相同。
5. 以 Nde I 和 Hind III 限制酶水解質體 DNA，並進行 DNA 電泳分析，以確定基因片段與載體接合，並定序且挑選正確接合方向的質體 DNA，以進行後續實驗(將此質體 DNA 命名為 pET22b(+)*h*-Fuc)。

2-5-3、基因定序(Sequencing)

取少量含有 pET22b(+)*h*-Fuc 質體的大腸桿菌 JM-109 菌株，將其塗在含有抗生素(Ampicillin, 100 μ g/ml)的細菌培養皿(Agar plate) 上，利用 pET22b(+)載體上的抗 Ampicillin 基因，於培養盤上長出單一菌落(single colony)，接著進行基因定序(委請明欣生物科技有限公司 DNA 定序)，分別定出正向 (Forward)和反向 (Reverse)的基因序列，並將取得的基因定序結果進行序列比對，確保基因序列正確無誤之後，接續進行後續的實驗。

2-5-4、定點突變(site-directed mutagenesis)

本研究所使用之定點突變方法為 Strategen 公司所開發之 Quick Change 法簡略圖如下：

設計原理：

步驟 1
質體製備

質體內目標基因
突變位置(●)

步驟 2
溫度循環

使質體失活後黏上有設計突變點的寡核苷酸引子

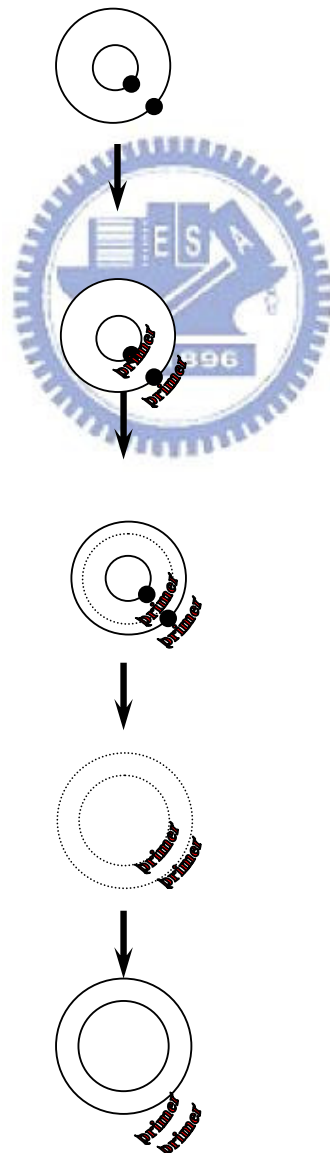
利用 *pfu* 聚合酵素延突變點寡核苷酸引子產生具缺口的圓形股

步驟 3
分解

利用 *Dpn* I 分解甲基股 DNA

步驟 4
轉型

將圓形有缺口的 DNA 轉型至大腸桿菌 JM-109，質體缺口會自行修復



2-5-5、定點突變之引子設計

由知道定點突變之原理，設計 28~35 不等寡核苷酸引子，利用 primer 5 軟體設計改變所要突變胺基酸之鹼基序列：

E70G(+) 5' -GCC TGG GGC AGC GGC TGG TTC TGG TGG CAC - 3'

E70G(-) 5' - GTG CCA CCA GAA CCA GCC GCT GCC CCA GGC - 3'

E79G(+) 5' -GCA CTG GCA GGG CGG GGG GCG GCC GCA - 3'

E79Q(-) 5' -TGC GGC CGC CCC TGG CCC TGC CAG TGC - 3'

E135G(+) 5' - ACG ACA AAG CAT CAC GGC GGC TTC ACA AAC - 3'

E135G(-) 5' - GTT TGT GAA GCC GCC GTG ATG CTT TGT CGT - 3'

D158G(+) 5' - GGG CCT CAT CGG GGC TTG GTT CGT GAA - 3'

D158G(-) 5' - TTC ACC AAC CAA GCC CCG ATG AGG CCC - 3'

D225G(+) 5' - CTG ATA TGG TCT GGC GGG GAG TGG GAA - 3'

D225N(-) 5' - TTC CCA CTC CCC GTT AGA CCA TAT CAG - 3'

D258G(+) 5' - GTG GTA GTA AAT GGC CGA TGG GGT CAG - 3'

D258N(-) 5' - CTG ACC CCA TCG GTT ATT TAC TAC CAC - 3'

E275G(+) 5' - GGA TAC TAT AAC TGT GGA GAT AAA TTC AAG - 3'

E275Q(-) 5' - CTT GAA TTT ATC CTG ACA GTT ATA GTA TCC - 3'

D276G(+) 5' - TAC TAT AAC TGT GAA GGC AAA TTC AAG - 3'

D276G(-) 5' - CTT GAA TTT GCC TTC ACA GTT ATA GTA - 3'

E289G(+) 5' - GAT CAC AAG TGG GGG ATG TGC ACC - 3'

E289Q(-) 5' - GGT GCA CAT CTG CCA CTT GTG ATC - 3'

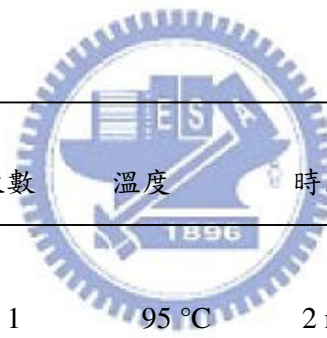
2-5-6、定點突變操作步驟

1. Sample reaction 的準備:

- (2) 10X reaction buffer : 5 μ l
- (3) dsDNA (50 ng/ μ l) 模板 (pET22b(+)_*h*-Fuc 質體模板) : 3.5 μ l
- (4) 順股寡核苷酸引子 (125 ng/ μ l) : 1 μ l
逆股寡核苷酸引子 (125 ng/ μ l) : 1 μ l
- (5) 10 mM 的 dNTP mix : 1 μ l
- (6) 加入 ddH₂O 使最後體積 : 50 μ l

2. 加入 1 μ l 的 *pfu* DNA 聚合酵素(2.5 U/ μ l)。

3. 進行 PCR 反應



區間	次數	溫度	時間
1	1	95 °C	2 min
2	20	95 °C	30 sec
		57.5 °C	30 sec
		69 °C	2 min/kb (<i>pfu</i>)
3	1	69 °C	1 min
	1	4 °C	30 min

4. PCR 完成後，取 5 μ l 進行 DNA 電泳分析後，加入 1 μ l 的 Dpn I 限制酵素，於 37 °C 水浴下作用 8~10 小時。

5. 進行轉型反應至勝任細胞大腸桿菌 JM-109 培養，其實驗方法與步驟同**章節 2-4** 所描述，並定序確定突變之鹼基完整正確。

2-6、菌種保存

在 25 % 甘油下儲存於 -80 °C 冰箱。

2-7、重組之人類 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素於大腸桿菌系統中的表現(expression)

2-7-1、質體 DNA 的轉型

勝任細胞：大腸桿菌 BL21(DE3) 菌種。

質體：野生株: pET22b(+)_h-Fuc 和各突變株: E70G、E79G/Q、E135G、D158G、D258G、E275G、D276G、D225G/N、E289G/Q。

將儲存在 -80 °C 的勝任細胞放置冰上，分別加入少量質體，快速混合均勻，於冰上靜置 30 分鐘後，42 °C 水浴 60-65 秒鐘，快速移至冰上靜置 1-2 分鐘後，加入 100 μ L 的 LB 培養液，於 37 °C 培養箱搖晃培養約 1 小時，再將培養後的菌液塗佈在預先回溫的 LB-Amp 培養皿上，放置 37 °C 培養箱約 12 小時(步驟可參考章節 2-4)。

2-7-2、重組人類 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素的生長活性曲線測試

轉型後生長在 LB-Amp 固體培養皿上的大腸桿菌單菌落，挑起置於 5 ml 之 LBA 培養液試管中，培養 8 小時，後取 1 ml 的菌液加入 50 mL LBA 培養液中培養，待菌液之 OD₆₀₀ 達 0.4~0.5，分別添加與不添加 2 mM IPTG 誘導，在不同時間點分別取樣做活性測試與蛋白質電泳分析，觀測重組人類 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素分泌情形與活性。

2-7-3、重組人類 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素的活性測試

取 5 mL 培養菌液以高速離心，去上層液，沉降的菌體加入 200 μ l 的 20 mM 醋酸鈉緩衝溶液(pH 5.7)，以超音波震盪(sonication)打破菌體，高速離心取得上層的胞內酵素溶液。

將 10 μ l 的糖苷受質(1 mM, pNPF)置於 210 μ l 磷酸氫二鈉緩衝溶液(50 mM, pH 7.0)中，以維持反應時的酸鹼值，再加入 30 μ l 胞內酵素溶液，使用 UV 吸收光譜儀觀測波長 400 nm 的吸收值增加率。

2-8、重組人類 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素之純化

2-8-1、菌種來源



野生株：pET22b(+)_h-Fuc 表現質體轉至於大腸桿菌 BL21(DE3)中，表現人類 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素。突變株：由野生株經定點突變而來，也於大腸桿菌 BL21(DE3)中，表現各突變株人類 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素。

2-8-2、胞內粗提取液的取得

取 -80 °C 中含 pET22b(+)_h-Fuc 之大腸桿菌 BL21(DE3)存菌，適量加入 5 ml 的 LB 培養液中，於 37 °C 培養箱，轉速 120 rpm 下培養約 8 小時，將此 5 ml 培養液，接種到 1 L 之 LBA 液體培養液中，加入 2 ml 濃度為 1 M 的 IPTG 溶液 (最後濃度為 2 mM)，在 37 °C 下，培養箱轉速 100 rpm 培養 30 小時。在開始純化之前，約取 3 ml 菌液，以 14,000 rpm 離心，倒掉上清液，加入 pH 5.7 之醋酸鈉緩衝溶液 0.2 ml 溶解

菌體，以超音波震盪使菌體破裂(45W，75 % pulse)；以 14,000 rpm 離心 3 分鐘，將上層液加入受質 pNPF，在 37 °C 下反應，觀察 UV 波長 400 nm 有無吸收值增加改變，即受質 pNPF 為酵素所反應水解，以確定酵素之活性。

收下菌液在 4 °C 以 7,000 rpm 離心 10 分鐘，棄去上層液。取離心下的菌體，以 10 ml 醋酸鈉緩衝溶液(10 mM，pH 5.7) 溶解菌體，搖晃使成均勻懸浮。加入 10 mM 的 PMSF 於 10 µl/ml 菌液，以超音波震盪使菌體破裂(45W，75% pulse)，在 4 °C 以 17,000 rpm 離心 20 分鐘，將上層液與細胞殘骸分開，此上層液即胞內粗提取液。

2-8-3、銨鹽沉澱蛋白質

1. 將所得之胞內粗提取液置入冰浴的燒杯中，慢慢加入硫酸銨(Ammouium sulfate) 攪拌，加入硫酸銨使達到 20 %且完全溶解。
2. 以 17,000 rpm，在 4 °C 下離心 15 分鐘，將上層液與沉澱蛋白質分開，取其上層液離心液。
3. 利用硫酸銨重量體積百分比與克數換算表計算 20 %至 85 %所需硫酸銨克數。
4. 將上層液離心液繼續置入冰浴的燒杯中，慢慢加入步驟 3.之硫酸銨克數攪拌，加入硫酸銨攪拌至完全溶解。
5. 以 17,000 rpm，在 4 °C 下離心 15 分鐘，將上層液與沉澱蛋白質分開，取其沉澱蛋白質，即為 20 % ~ 85 %之銨鹽沉澱蛋白質。
6. 將步驟 5.之銨鹽沉澱蛋白質，以醋酸鈉緩衝溶液(20 mM，pH 5.5)回溶，取 1.5 ml 導入預先以相同醋酸鈉緩衝溶液平衡之 HiTrap 除鹽管柱(Desalting column)中，再將 2 ml 醋酸鈉緩衝溶液導入 HiTrap 除鹽管柱中，收集除鹽後的酵素溶液，重複數次直到所有的回溶液除鹽完畢。即為 20 % ~ 85 %銨鹽沉澱之蛋白質溶液。

2-8-4、HiTrap SP 陽離子交換樹脂管柱層析

1. 將 5 ml 的上述步驟 6. 之 20 %~85 % 銨鹽沉澱之蛋白質溶液，導入預先以醋酸鈉緩衝溶液(20 mM，pH 5.5)平衡之 HiTrap SP 陽離子交換樹脂管柱，進行層析分離。
2. 鹽類梯度為 0 到 1 M，流速為 1.5 ml/min，沖提體積為 300 ml。
3. 收集方式為每管 2.5 ml 沖提液。
4. 收集完畢後由試管取樣，加入受質 pNPF，在 37 °C 下反應，觀察有無黃色變化，即受質 pNPF 為酵素所反應水解，藉此測定酵素的活性區域。

2-8-5、HiTrap Q 陰離子交換樹脂管柱層析

1. 將經 HiTrap SP 陽離子交換樹脂管柱層析，所得有酵素活性反應之試管收集，以分子量 10,000 的濃縮管柱濃縮。
2. 將所得的濃縮液以 1.5 ml 導入預先以磷酸氫二鈉緩衝溶液(10 mM，pH 6.2)平衡之 HiTrap 除鹽管柱中，再將 2 ml 磷酸氫二鈉緩衝溶液導入 HiTrap 除鹽管柱中，收集除鹽後的酵素溶液，重複數次直到所有的濃縮液除鹽完畢。
3. 將 5 ml 步驟 2. 之除鹽的酵素溶液，導入預先以磷酸氫二鈉緩衝溶液(20 mM，pH 6.2)平衡之 HiTrap Q 陰離子交換樹脂管柱，進行層析分離。
4. 鹽類梯度為 0 到 1 M，流速為 1.2 ml/min，沖提體積為 300 ml。
5. 收集方式為每管 2.0 ml 沖提液。
6. 收集完畢後由試管取樣，加入受質 pNPF，在 37 °C 下反應，觀察有無黃色變化，即受質 pNPF 為酵素所反應水解，藉此測定酵素的活性區域。

2-8-6、凝膠樹酯 G-75 管柱層析

1. 將經 HiTrap Q 陰離子交換樹脂管柱層析，所得有酵素活性反應之試管收集，以分子量 10,000 的濃縮管柱濃縮。
2. 將所得的濃縮液以 1.5 ml 導入預先以醋酸鈉緩衝溶液 (10 mM, pH 5.7) 平衡之 HiTrap 除鹽管柱中，再將 2 ml 醋酸鈉緩衝溶液導入 HiTrap 除鹽管柱中，收集除鹽後的酵素溶液，重複數次直到所有的濃縮液除鹽完畢。
3. 將 1 ml 步驟 2. 之除鹽的酵素溶液，導入預先以醋酸鈉緩衝溶液 (50 mM, pH 5.7) 平衡之凝膠樹酯 G-75 管柱，進行層析分離。
4. 使用 50 mM 醋酸鈉緩衝溶液 (內含 10 mM NaCl, pH 5.7) 沖提，流速為 0.7 ml/min。
5. 收集方式為每管 1.5 ml 沖提液。
6. 收集完畢後由試管取樣，加入受質 pNPF，在 37 °C 下反應，觀察有無黃色變化，即受質 pNPF 為酵素所反應水解，藉此測定酵素的活性區域。



2-9、建構含 6-His 胜肽區域之 *h*-Fuc 突變株 D225G/N、E289G/Q

酵素表現質體

為了方便純化突變株 D225G/N、E289G/Q 之人類岩藻糖水解糖苷酵素，將實驗章節 2-5-6 之各 *h*-Fuc 突變株 D225G/N、E289G/Q 質體基因序列上所含之停止轉譯密碼刪去，並與質體 pET22b(+)之 6-His 的基因序列接合，使各突變株 *h*-Fuc 基因於轉譯表現時帶有 6-His 胜肽區域：

步驟：

1. 利用 plasmid extract kit，抽取突變株 D225G/N、E289G/Q 酵素之 *h*-Fuc 質體基因 pET22b(+)*h*-Fuc。
2. 利用設計的寡核苷酸引子，包含 Nde I 和 Hind III 限制酶水解序列 HAFU_h：
5'-CTGCAGCACATATGGTGCCTCGGGCCCCAGCCTC-3' 和 HAFU_{t1}：
5'-GCGGCCGCAAGCTTCTTCACTCCTGTCAGCT-3' (為刪除 *h*-Fuc 基因序列上的終止轉譯密碼)，以實驗步驟 2-5-1 之方法放大各突變株質體上之 *h*-Fuc 基因，並以 PCR 純化管柱進行放大基因之回收。
3. 將步驟 2. 所利用 PCR 純化管柱回收 *h*-Fuc 之各突變株放大基因與 pET22b(+)表現載體(環狀)，皆以 Nde I 和 Hind III 限制酶水解，並使用 DNA 膠回收純化管柱，回收所需的基因片段。
4. 依實驗步驟 2-5-2 的基因接合方式，將步驟 3. 所純化回收的各突變株 D225G/N、E289G/Q 之 *h*-Fuc 放大基因，與載體 pET22b(+)進行接合反應。
5. 依前述實驗步驟進行接合基因的定序與表現。
6. 將表現於大腸桿菌 BL21(DE3)中，含 6-His 胜肽區域之各突變株 D225G/N、E289G/Q *h*-Fuc 酵素表現粗提液，進行實驗步驟 2-8-3 銨鹽沉澱蛋白質，後除鹽；最後，以 Ni²⁺-管柱 (HisTrap™ HP) 在 0-500 mM imidazole 沖提液進行梯度層析純化，即可得均質度 90 % 以上的各突變株 D225G/N、E289G/Q *h*-Fuc 酵素。

2-10、SDS-PAGE 決定蛋白質均質度 (homology)

Laemmli 於 1970 年提出 SDS-PAGE 系統中，蛋白質分子在電泳膠片上因分子量大小不同會形成不同的帶狀方式，可以檢驗蛋白質的均質度，也可用來估計分子量大小。

1. 製備電泳膠片與電泳分離蛋白質

1. 製作堆積膠 (Stacking gel) 為 7%，分離膠 (Separation gel) 為 17.5% 之電泳膠片，規格為 10 cm × 7.4 cm × 0.1mm 其製備如下：

	Running gel	Stacking gel
50% Acrylamide / Bisacrylamide (48.28 g Acrylamide, 1.72 g Bisacrylamide)	1.64 mL (一片)	0.35 mL (一片)
2M Tris-H ₃ PO ₄ (pH = 8.9)	1.23 mL	
10% SDS	65.63 μl	24.75 μl
APS in IPA (10%)	32.81 μl	12.75 μl
TEMED	10 μl	3.5 μl
H ₂ O	3.59 mL	1.78 mL
1M Tris-H ₃ PO ₄ (pH = 6.5)		312.75 μl

2. Sample loading buffer 的製備

- (1) 1 M Tris-HCl (pH 6.8) : 0.6 mL
- (2) 50% glycerol : 5 mL
- (3) 2-mercaptoethanol : 0.5 mL
- (4) 0.1% bromophenol blue : 1 mL
- (5) 10% SDS : 2 mL
- (6) H₂O : 0.9 mL

Total volume = 10 mL

3. 將各步驟純化之蛋白質溶液取 30 μ l 與 5 μ l Sample loading buffer 混合後，95 $^{\circ}$ C 加熱 2 分鐘。

4. Tris-glycine running buffer 之配製 (4x)

(1) Glycine : 56 g

(2) Tris-Base : 12 g

(3) SDS : 4 g

Total volume : 1L

加入 800 mL 稀釋過之 running buffer (1x)，將 Sample loading buffer 混合液置入膠片上端之樣品槽。以 150 伏特固定電壓，Tris-glycine running buffer 的系統通電約 1.5 小時。

2. Coomassie Brilliant Blue G-250 染色法



材料：

(1) Stain solution : 200 mL acetic acid, 500 mL Isopropanol,
0.6 g Coomassie blue, 1.3 L Mini-Q H₂O

(2) Destain solution : 400 mL acetic acid, 400 mL Isopropanol,
3.2 L Mini-Q H₂O

方法：

(3) 將電泳膠片(規格為 10 cm \times 7.4 cm \times 1 mm)浸泡在 Stain solution 中搖晃 30 分鐘 ~ 1 小時。

(4) 倒去 Stain solution，將電泳膠片浸泡在 Destain solution 中搖晃 30 分鐘 ~ 1 小時，甚至更久。

(5) 倒去 Destain solution，將膠片以自然風乾的形式乾燥。

2-11、蛋白質分子量與濃度的測定

2-11-1、液相層析-質譜儀(LC-MASS)測定蛋白質的分子量

1. 將濃度 3.5~4 mg/ml 之純化的人類 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素 注入 Zip-Tip (Millipore) 管柱中，幫浦以 0.1 mL/s 之流速，注入 $H_2O:CH_3CN:1\% HCOOH = 80:10:10$ 混合液流洗出管柱內鹽類，再注入 $IPA:CH_3CN:HCOOH = 10:10:4$ 混合液將蛋白質由管柱流洗入質譜儀偵測蛋白質分子量。
2. 將濃度 3.5~4 mg/ml 之純化的突變株 E289G 酵素，分別和 9 mM 之糖苷受質 FPNF 或 pNPF 反應 8 小時後，依步驟 1. 偵測分析反應後的突變株 E289G 酵素蛋白質分子量。

2-11-2、檢量線的建立



使用 Bicinchoninic Acid (BCA) Assay 建立蛋白質檢量線，做為估計蛋白質質量的標準。室溫下，以 Bicinic acid : 4% (w/v) Copper (II) sulfate 體積比為 50:10 的混合液，做為 Standard Working Reagent (SWR)。將不同濃度標準品牛血清蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 與 SWR，以體積 1:20 (BSA:SWR) 混合，放置 37 °C 下 30 分鐘，再於室溫下靜置 10 分鐘，測量在波長 562 nm 之吸收值。

2-11-3、純化的野生株與各突變株酵素之濃度測定

建立檢量線同時，將純化的人類岩藻糖水解糖苷酵素分別取 10 μ l 與 20 μ l 於 SWR 中混合，與 BCA 相同條件下測量波長 562 nm 之吸收值。

相同條件之量測量波長 280 nm 之吸收值，往後皆依此換算純化之蛋白質濃度用於動力學之實驗。

2-12、芳香基團 α -L-岩藻糖苷化合物以及抑制藥物之衍生物的合成

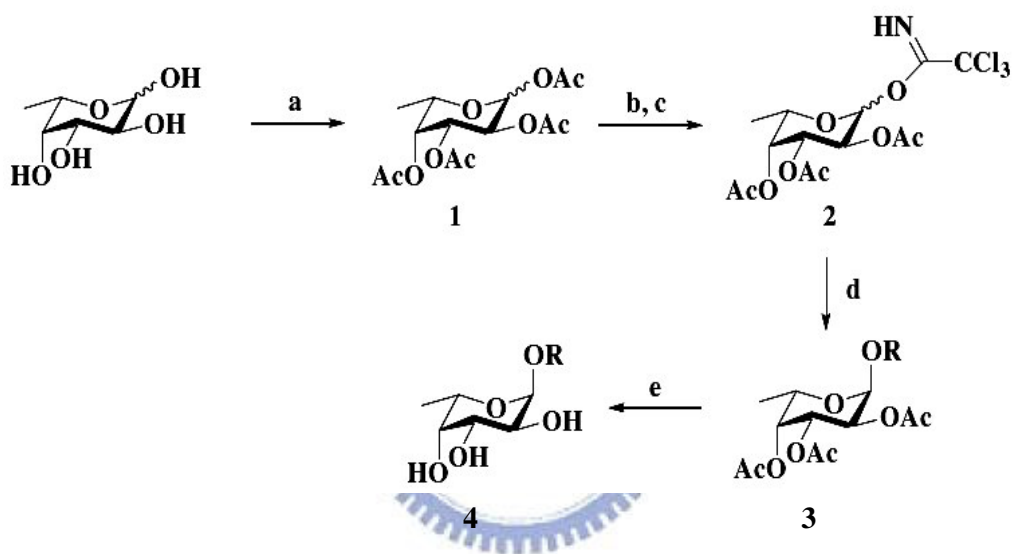
2-12-1、一般敘述

1. 核磁共振光譜 (NMR) 的測定使用 Bruker DRX-300 型核磁共振光譜儀。所使用的溶劑為 D_2O 時，以 D_2O 之 $\delta 4.72$ 為內標準，使用 $CDCl_3$ 時，以 $CDCl_3$ 之 $\delta 7.24$ 為內標準。化學位移單位為 ppm，耦合常數 (coupling constant) 單位 Hz。s 表示單峰(single)，d 表二重峰(doublet)，t 表三重峰(triplet)，q 表四重峰(quarter)，m 表多重峰(multiplet)，b 表寬峰(broad peak)。
2. 色層分析：薄層分析 (TLC) 係使用 Merck Silica gel 60 F₂₅₄ (aluminium sheet TLC)。重力管柱層析分析係使用 ICN SiliTech 32-63 60Å (230~400 mesh) 型矽膠當填充物。
3. TLC 薄層分析之染色劑係使用 Ninhydrin solution(0.3 克 ninhydrin in 100 毫升 n-butanol ; add 3 毫升 acetic acid)，Anisaldehyde solution(9.2 毫升 Anisaldehyde、3.75 毫升 Acetic acid、338 毫升 EtOH(95%)、12.5 毫升 H_2SO_4)。
4. 藥品購自於 Sigma-Aldrich、Acros 公司(TCI)。
5. Activated CH Sepharose 4B 購自於 Amersham Bioscience。
6. 反應用有機溶劑購自 TEDIA、Merck。
7. 展開液 (developing solvent) 皆經自工業級溶劑蒸餾後使用。
8. 減壓濃縮機係使用 EYELA ROTARY VACUUM EVAPORATOR N-N series 型旋轉濃縮機。
9. 冷凍乾縮係使用 PANCHUM FREEZE DRYER CT-series 型冷凍乾縮機。

2-12-2、對硝基苯 α -L-岩藻糖苷化合物的合成

(*p*-nitrophenyl- α -L-fucopyranoside, pNPF)

利用本實驗室張世聖所建立的一套合成方式，只要改變不同的 Acceptor 即可以順利的取得一系列的芳香類 α -L-岩藻糖苷化合物。



R= 3-nitrophenyl、4-nitrophenyl、2,4-dinitrophenyl、phenyl、2-methyl-4-nitrophenyl、
3,4-dinitrophenyl、4-cyanophenyl、2-fluro-4-nitrophenyl

圖 2-1、芳香類 α -L-岩藻糖苷化合物合成反應步驟之試劑與條件:

- (a) Ac_2O ，Pyridine，rt，8 h；
- (b) $\text{H}_4\text{N}_2\text{-HOAc}$ ，DMF，rt，30 min；
- (c) CCl_3CN ， Cs_2CO_3 ， CH_2Cl_2 ，rt，8 h；
- (d) ROH (acceptor)，TMSOTf，4Å MS， CH_2Cl_2 ， -20°C ，30 min；
- (e) NaOMe，MeOH，rt，30 min

2,3,4-Tri-*O*-acetyl- α -fucopyranosyl acetate的合成 (OAc保護基的合成, Acetylation)

方驟:

1. 取岩藻糖苷 1 克，加入除水過之吡啶(10 mL)，蓋血清塞、插上氮氣球，並放置冰浴 15 分鐘。
2. 取醋酸酐 15 ml，慢慢的滴入反應瓶中，加完醋酸後，移開冰浴，反應 overnight。
3. 以 TLC 確認反應起始物皆已消失，則中止反應。減壓抽氣，濃縮至黏稠狀。以二氯甲烷(dichloromethane, DCM)當作溶劑，以水萃取兩次，再依序以 1N HCl 水溶液飽和碳酸氫鈉水溶液以及飽和食鹽水萃取；並合併有機層，加入無水硫酸鎂(MgSO₄)除水，減壓抽氣濃縮至黏稠狀。
4. 以沖提液 Hexane/EA=9/1 到 Hexane/EA=7/3 的極性梯度，進行管柱層析法純化，並減壓抽氣濃縮至乾，可得 0.88 克產物(1)，產率 88 %。

1-(trichloroacetimidate)-2,3,4-Tri-*O*-acetyl- α -fucopyranoside 的合成

方驟:

1. 將已完成 acetylation 保護的產物(1)秤取 600 毫克，將其溶解於含有 183 毫克 Hydrazine acetate 的 3 毫升 DMF 中，於室溫下進行反應。
2. 約 30 分鐘後結束反應；以乙酸乙酯(ethyl acetate)當作溶劑，以水萃取兩次，再依序以飽和碳酸氫鈉水溶液以及飽和食鹽水萃取，有機層加入無水硫酸鎂(MgSO₄)除水，減壓抽氣濃縮至黏稠油狀，此油狀物即為粗產物。

3. 取步驟 2. 的粗產物、 CCl_3CN 以及碳酸鋇溶解於二氯甲烷中進行反應。其中粗產物與 CCl_3CN 當量數為 1:1，而碳酸鋇則加入催化量。
4. 反應進行約 8 小時以後；以乙酸乙酯(ethyl acetate)當作溶劑，以水萃取兩次，再依序以飽和碳酸氫鈉水溶液以及飽和食鹽水萃取，有機層加入無水硫酸鎂(MgSO_4)除水，減壓抽氣濃縮至黏稠油狀，此油狀物即為粗產物(2)。此油狀物不再經過進一步的純化，產率約 93% ($\alpha:\beta = 7:1$) 將直接進行下一階段的反應。

1-(4-nitrophenyl)-2,3,4-Tri-O-acetyl- α -fucopyranoside 合成

方驟:

1. 取上個階段的粗產物(2)約 364 毫克與 140 毫克的 4-nitrophenol (Acceptor) 混合，加入 500 毫克 4\AA 無水分子篩溶解於 5 毫升的甲苯中並將其濃縮以共沸除水，除水的動作必須進行 3 次。
2. 將上步驟的產物溶解於 3 毫升的二氯甲烷中，再加入 150 微升 TMSOTf 於 -20°C 反應 30 分鐘。
3. 使用沖提液 ethylacetate / hexane = 1/6 進行 silica-gel 管柱層析純化，純化後取得的產物(3)再使用 ethylacetate 和 hexane 進行再結晶，產率約為 56 %。

1-(4-nitrophenyl)-2,3,4-Tri-O-hydroxyl- α -fucopyranoside 合成

方驟:

1. 將上階段的產物(3)稱取 1 克溶解於 30 毫升的無水甲醇中；加入 32 毫克的 NaOMe 於室溫下反應 2 小時。
2. 以 TLC 追蹤反應，當三個保護基均被移除的產物即為主要產物，立即終止反應。

3. 使用 IR-120 酸性樹脂萃取後，減壓抽氣濃縮將溶劑移除後即可得到粉末狀的產物(4)，產率約為 82 %。

2-12-3、不同芳香基團 α -L-岩藻糖苷化合物的合成

於合成產物(3)時，改變不同芳香族化合物的 Acceptor，如 3-nitrophenyl、4-nitrophenyl、2,4-dinitrophenyl、phenyl、2-methyl-4-nitrophenyl、3,4-dinitrophenyl、4-cyanophenyl、2-fluoro-4-nitrophenyl，即可取得各芳香類 α -L-岩藻糖苷化合物。

2-12-4、2-氯對硝基苯 α -L-岩藻糖苷化合物的合成

(2-chloro-4-nitrophenyl- α -fucopyranoside, CNPF)

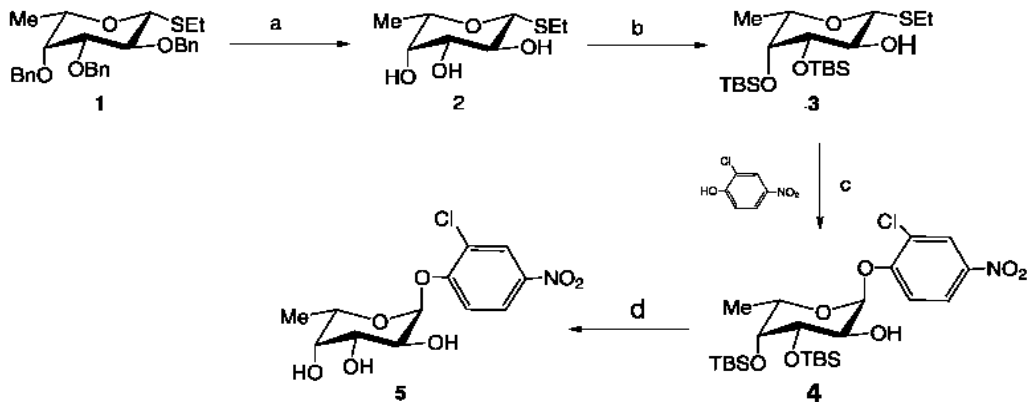


圖2-2、CNPF合成反應步驟之試劑與條件:

- (a) H_2 , $Pd(OH)_2/C$, MeOH_EtOAc, 77% for **2** ;
- (b) TBDMSCl, imidazol, DMF, 78% for **3** ;
- (c) NIS, TMSOTf, CH_2Cl_2 , 73% for **4** ;
- (d) HF_pyridine, CH_3CN , 68% for **5** .

步驟:

1. 取 5 克之 L-Fucose，根據文獻⁽⁸⁹⁾所提供合成步驟，合成化合物 1，約為 4.3 克。
2. 取 0.415 克(0.71 mmol)之化合物 1，溶於 6 ml 的 MeOH/EtOAc (2:1)中，加入 Pd(OH)₂/C (40 mg)，放入磁石、蓋血清塞。
3. 於反應瓶中通入氫氣(H₂)，流速為 80 mL/min，在室溫下反應 10 小時。
4. 以 TLC 確認反應起始物皆已消失則中止反應，減壓抽氣濃縮至黏稠狀。
5. 以沖提液 petroleum ether/EtOAc (3:1)，進行管柱層析法純化，可得化合物 2 (約 0.306 克)，產率 79 %。
6. 取 1.04 克(5 mmol)之化合物 2，溶於 5 mL 的 N,Ndimethylformamide(DMF)中，加入 imidazole (2.04 克, 30 mmol) 和 Tert-butyldimethylsilyl chloride (TBDMSCl) (2.26 克, 15 mmol)，放入磁石、蓋血清塞，在氫氣系統下，以溫度 0 °C，反應 30 分鐘；後加熱至溫度 40 °C，繼續反應 12 小時。
7. 以 TLC 確認反應起始物皆已消失則中止反應，以二氯甲烷當作溶劑，以水萃取一次，再以飽和碳酸氫鈉水溶液以及飽和食鹽水萃取，並合併有機層，加入無水硫酸鎂(MgSO₄) 除水，減壓抽氣濃縮至黏稠狀。
8. 以沖提液 petroleum ether/EtOAc (20:1)，進行管柱層析法純化；可得化合物 3(約為 0.8 克)，產率 78 %。
9. 取 2.0 克(3.73 mmol)之化合物 3 和 0.712 克(4.1 mmol)之 2-chloro-4-nitrophenol，放入反應瓶中，以溫度 60 °C 抽氣濃縮乾燥，加入無水二氯甲烷 10 ml，NIS (0.923 克, 4.01 mmol)和 TMSOTf (30 μl, 0.19 mmol)，放入磁石、蓋上血清塞、插上氫氣球，在溫度-42 °C 下，反應 30 分鐘。
10. 以 TLC 確認反應起始物皆已消失則中止反應，打開血清塞，加入 Et₃N 中和反應，以減壓抽氣濃縮至黏稠乾燥狀。
11. 以沖提液 petroleum ether/EtOAc，從 30:1 至 20:1 的梯度，進行管柱層析法純化；可得化合物 4 (約為 1.25 克)，產率 61 %。
12. 取 1.0 克(1.54 mmol)之化合物 4 溶於 4 ml 的吡啶和 15 mL 之乙腈，慢慢加入 15 mL

之 HF/吡啶 (70 %), 放入磁石、蓋上血清塞、插上氮氣球, 在溫度 0°C 下, 反應 20 小時。

13. 以 TLC 確認反應起始物皆已消失則中止反應, 減壓抽氣濃縮至黏稠乾燥狀。

14. 以 EtOAc 為從沖提液, 進行管柱層析法純化; 可得化合物 5(約為 0.335 克), 產率 68 %。

2-12-5、抑制劑 *O*-hydroxyl-1-(2,3-epoxypropyl)- α -L-fucopyranoside (EPFP) 之合成

本抑制劑由中研院林俊宏老師提供, 下圖 2-3 為其所提供之合成步驟示意圖。

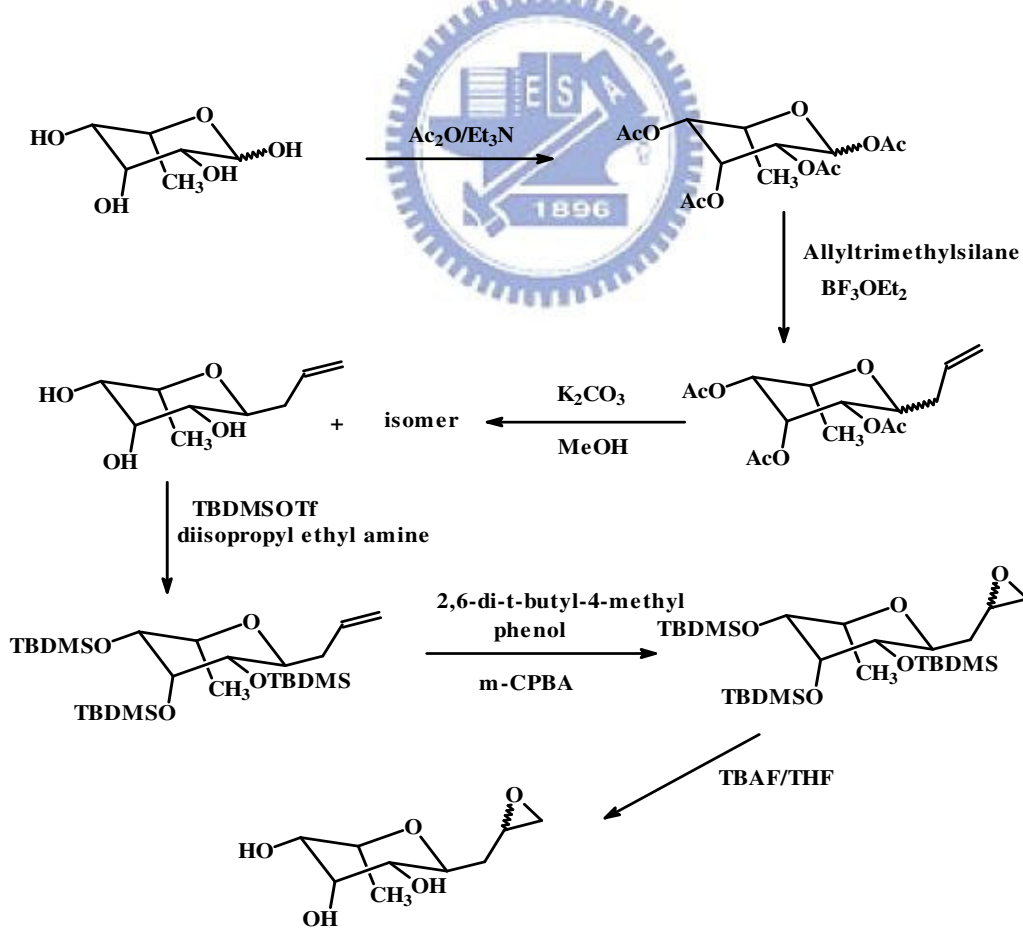


圖 2-3、為 EPFP 之合成步驟與試劑

2-12-6、抑制劑 Fuconolactone 的合成

由於 Fuconolactone 的結構與人類 α -L-岩藻糖水解糖苷酶進行水解反應時的反應中間體 oxocarbenium ion 類似，因此可能與酶分子具有較高的親和力。本實驗合成 Fuconolactone 進行抑制劑的分析，探討酶可能的反應中間體結構。

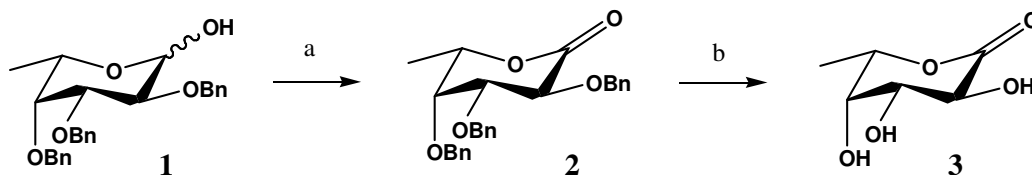


圖 2-4：Fuconolactone 合成反應步驟之試劑與條件：

(a) PCC, CH_2Cl_2 , 4Å MS, rt, 1 h；

(b) H_2 , 5% Pt (C), EtOH, rt, 12 h。

1. 取起始物(1) 40 毫克(製備方式請參考文獻⁽⁹⁰⁾)溶於 3 毫升的二氯甲烷後再加入 170 毫克的 PCC；加入 250 毫克 4Å 分子篩，室溫下反應 1 小時。
2. 使用沖提液 ethylacetate / hexane = 1/4 進行 silica-gel 管柱層析純化，純化後取得的產物利用減壓抽氣濃縮將溶劑移除即可取得產物(2)。
3. 取 80 毫克產物(2)溶於絕對酒精中，加入 10 毫克的 5% Pt(C)並將反應瓶通入氫氣於室溫下進行反應，反應約 12 小時後完成。
4. 反應後的溶液使用 celite 過濾移除 Pt(C)；再使用沖提液 methanol / dichloro methane = 1/6 進行 silica-gel 管柱層析純化，減壓抽氣濃縮將溶劑移除後即可得到產物 Fuconolactone.

2-13、重組人類 α -L-岩藻糖水解糖苷酶的特性研究

2-13-1、溫度對酶活性的影響

本實驗之目的在得知，於相同 pH 值不同溫度下，溫度的改變對 α -L-岩藻糖水解糖苷酶活性的影響，以了解酶活性隨溫度變化的情形。

步驟：

1. 取 370 μ l 以 50 mM 磷酸緩衝溶液(pH 7.0)所配置之 0.25 mM pNPF 反應受質，在 4 $^{\circ}$ C 預熱。
2. 加入純化過的 30 μ l 野生株 *h*-Fuc 酶素，讀取波長 400 nm 吸光值的增加率，記錄其零級初始反應速率(initial velocity)。
3. 同步驟 1. 和 2.，分別在 16 $^{\circ}$ C、25 $^{\circ}$ C、37 $^{\circ}$ C、45 $^{\circ}$ C、55 $^{\circ}$ C、65 $^{\circ}$ C、75 $^{\circ}$ C、85 $^{\circ}$ C、95 $^{\circ}$ C 讀取波長 400 nm 吸光值的增加率，記錄其零級初始反應速率。
4. 將酶活性除以莫耳吸收係數，所得活性則與離去基吸光度無關。以此活性對溫度作圖，得到活性隨溫度變化的關係圖。

2-13-2、溫度對酶穩定度的影響(Thermostability)

本實驗的目的在於了解相同 pH 值，不同溫度下，人類 α -L-岩藻糖水解糖苷酶的活性反應穩定度受溫度變化的影響，以便了解酶活性穩定的溫度區間。

步驟：

1. 加純化過的 30 μ l 野生株 *h*-Fuc 酶素，於 25 $^{\circ}$ C 預熱之 370 μ l 含有受質 0.25 mM pNPF 的 50 mM 磷酸緩衝溶液下，讀取波長 400 nm 吸光值的增加率，記錄其零級

- 初始反應速率(initial velocity)，將此反應速率設為標準速率，並定此為標準值 1。
2. 將純化過的 500 μl 野生株 *h*-Fuc 酵素，於 25 $^{\circ}\text{C}$ 下放置 1, 20, 40, 60, 80, 100, 130, 160 分鐘，再取出定量酵素，同步驟 1. 的方式測定其波長 400 nm 吸光值的零級初始反應速率。
 3. 將步驟 2. 所得之零級初始反應速率除以步驟 1. 求出之標準速率，所得比值即為 25 $^{\circ}\text{C}$ 下，酵素在醋酸鈉緩衝溶液中置放不同時間的殘餘活性。
 4. 同步驟 2. 和 3.，測得酵素在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、45 $^{\circ}\text{C}$ 、55 $^{\circ}\text{C}$ 、60 $^{\circ}\text{C}$ 、65 $^{\circ}\text{C}$ 、75 $^{\circ}\text{C}$ 各個不同溫度下，存放不同時間後的殘餘活性。
 5. 將酵素活性除以莫耳吸收係數，所得活性則與離去基吸光度無關。以此將各溫度下的殘餘活性對時間作圖，即可得到在各個溫度下，不同時間中酵素殘餘活性的變化，此圖即可顯示出各溫度下的酵素穩定度。

2-13-3、酸鹼度對酵素活性的影響

本實驗的目的在於了解相同溫度下，酸鹼度對人類 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素活性的影響，以了解酵素作用的最佳酸鹼值範圍。所配置的不同 pH 值緩衝溶液為：Glycine/HCl (50 mM, pH 2、2.5、3)、Citric (50 mM, pH 3.5)、NaOAc (50 mM, pH 4、4.5、5、5.5)、MES (50 mM, pH 5.5、6)、 Na_2HPO_4 (50 mM, pH 6.5、7、7.5)、Hepes (50 mM, pH 7.5、8)、Tris (50 mM, pH 8、8.5)、Glycine/NaOH (50 mM, pH 9、9.5、10)、Caps (50 mM, pH 10、10.5)

步驟：

1. 配製各不同 pH 值的緩衝溶液，在 25 $^{\circ}\text{C}$ 預熱。
2. 加入純化過的 30 μl 野生株 *h*-Fuc 酵素及受質 0.25 mM pNPF，讀取波長 348 nm 吸光值的增加率，記錄其零級初始反應速率(initial velocity)。

3. 將酵素活性除以莫耳吸收係數，所得活性則與離去基吸光度無關。以此活性對 pH 值作圖，得到活性隨 pH 值變化的關係圖。

2-13-4、酸鹼度對酵素穩定度的影響(pH stability)

本實驗的目的在了解人類 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素處於不同酸鹼值的溶液中，其酵素穩定度隨時間變化的情形。所配置的不同 pH 值緩衝溶液為：
Glycine/HCl (50 mM, pH 2、3)、NaOAc (50 mM, pH 4、5)、MES (50 mM, pH 6)、
Na₂HPO₄ (50 mM, pH 7)、Tris (50 mM, pH 8)、Glycine/NaOH (50 mM, pH 9)

步驟：

1. 加純化過的 30 μ l 野生株 *h*-Fuc 酵素，於 25 °C 預熱之 370 μ l 含有受質 0.25 mM pNPF 的 50 mM 磷酸緩衝溶液下，讀取波長 400 nm 吸光值的增加率，記錄其零級初始反應速率(initial velocity)，將此反應速率設為標準速率，並定此為標準值 1。
2. 取 500 μ l 醋酸鈉緩衝溶液(50 mM, pH 5.0)，在 25 °C 下預熱。
3. 加入純化過的野生株 *h*-Fuc 酵素，於 25 °C 下放置 1, 20, 40, 60, 80, 100, 130, 160 分鐘，再取出定量酵素，同步驟 1.的方式測定其波長 400 nm 吸光值的零級初始反應速率。
4. 將步驟 3.所得之零級初始反應速率除以步驟 1.求出之標準速率，所得比值即為 25 °C 下，酵素在 pH 5.0 醋酸鈉緩衝溶液中置放不同時間的殘餘活性。
5. 同步驟 2.至 4.，測得酵素在不同 pH 值緩衝溶液中，存放不同時間後的殘餘活性。
6. 將酵素活性除以莫耳吸收係數，所得活性則與離去基吸光度無關。以此將各不同 pH 值的殘餘活性對時間作圖，即可得到在不同 pH 值下，不同時間中酵素殘餘活性的變化，此圖即可顯示出不同 pH 值下的酵素穩定度。

2-13-5、金屬離子及試劑對酵素活性的影響

本實驗的目的在於瞭解人類 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素處於不同的金屬離子中，其金屬離子對酵素反應活性的影響情形，各離子與還原試劑如： Cu^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Co^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Hg^{2+} 、EDTA、DTT 和 2-mercaptoethanol。

步驟：

1. 加入純化過的 30 μl 野生株 *h*-Fuc 酵素及 0.25 mM 受質 pNPF，於 25 $^{\circ}\text{C}$ 預熱之 pH 7.0 的 50 mM 磷酸緩衝溶液，讀取波長 400 nm 吸光值的增加率，記錄其零級初始反應速率(initial velocity)，將此反應速率設為標準速率，並定此為標準值 1。
2. 同步驟 1.，加入純化過的 30 μl 野生株 *h*-Fuc 酵素及 0.25 mM 受質 pNPF，於 25 $^{\circ}\text{C}$ 預熱之 pH 7.0 並含 5 mM 各金屬離子、還原試劑的 50 mM 磷酸緩衝溶液，讀取波長 400 nm 吸光值的零級初始反應速率。
3. 將步驟 2. 所得之各初始反應速率除以步驟 1. 求出之標準速率，所得比值即為酵素在含 5 mM 之各金屬離子、還原試劑溶液中相對活性，藉此判定各種金屬離子、試劑的存在對於 *h*-Fuc 酵素的活性是否有影響。

2-14、氫核磁共振光譜研究人類 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素催化

反應之立體選擇性

為了瞭解人類 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素在催化糖基受質 pNPF 的反應過程中，酵素所扮演的催化機制為何？利用氫核磁共振光譜對酵素催化反應之受質化學位移立體選擇性改變，判定人類岩藻糖水解糖苷酵素的催化機制。

步驟:

1. 以 D₂O 製備磷酸緩衝溶液(20 mM, pD 7.0), 再以此緩衝溶液配製受質 pNPF 溶液, 並以此緩衝溶液多次置換, 減少溶液中 H 的干擾。
2. 將適量純化之人類 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素, 以成 D₂O 多次置換 H₂O, 減少溶液中 H 的干擾。
3. 取出適量不含 H₂O 的酵素溶液, 偵測對 pNPF 的活性, 用以判定 NMR 反應中對作用受質的活性。
4. 取 0.5 ml 步驟 1.之受質 pNPF 放入 NMR 管中, 以此為對照組。
5. 加入適量酵素, 開始觀測反應之進行。在 0 ~ 200 分鐘之間各掃描觀測反應之進行。
6. 由所得圖譜中, 觀察反應產物之化學位移(chemical shift)為 5.12 和 4.48 的分裂吸收峰消長變化, 以分析此人類 α -L-岩藻糖水解糖苷對受質之催化立體特異性。



2-15、氫核磁共振光譜研究人類 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素共同反應中間體

分別稱取三反應受質 CNPF、pNPF 和 pCPF 各 2 mg, 加入 700 μ l 之醋酸銨緩衝溶液 (20 mM, pH 5.5) 以及 200 μ l 無水甲醇, 再加入 100 μ l 純化之重組野生株 *h*-Fuc 酵素(酵素之濃度約為 2.36 μ g / μ l); 總體積為 1 ml, 甲醇濃度為 6 M (~20%)。對照組與上述相同除未加入甲醇換成 200 μ l 緩衝溶液。

各管溶液放置在 37 °C 反應 36 小時, 之後直接進行冷凍乾燥; 以液態氮氣先冷凍再放入冷凍乾燥機裡乾燥, 直至沒有液體, 加入 0.5 mL 的 D₂O 回溶殘餘物, 再將液體抽乾; 重複此回溶步驟 2~3 次。最後, 加入 500 mL 的 D₂O 放入 NMR tube 中。取 0.5 ml 之三個反應受質分別放入 NMR 管中, 以此為對照組, 於 50 °C 下進行觀測。由所得圖譜中, 分析觀察各作用產物化學位移(chemical shift)之間的不同。

2-16、人類 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素動力學 k_{cat} 、 K_m 之研究

一般而言， K_m 值的求法可用以下兩種方法求得：

Michaelis-Menten equation 及雙倒數作圖法 (double reciprocal plot)，敘述如下⁽¹⁹⁾：



依 steady-state 假設可得以下速率方程式：

$$V = V_{max} [S] / K_m + [S] \quad V_{max} = k_{cat} \times [E]_t$$

$[E]_t$ ：總酵素濃度

k_{cat} ：速率決定步驟速率常數

兩邊取雙倒數，即為雙倒數作圖法：

$$1/V = K_m/V_{max} \cdot 1/S + 1/V_{max}$$

V_{max} ：受質濃度無限大時反應速率所趨近的極限速率值

K_m ：速率為極限速率一半時的受質濃度

雙倒數作圖中斜率為 K_m/V_{max} ，縱軸之截距為 $1/V_{max}$ ，而橫軸之交點為 $-1/K_m$ ，斜率對縱軸截距的比值即為 K_m 。

動力學反應條件：純化之 *h*-Fuc 酵素 (濃度為 0.95 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)，在 50 mM 磷酸氫二鈉緩衝溶液下，pH 6.8，分別對不同濃度之 aryl substrates (不同芳香族官能基受質) 進行水解反應，以 UV 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 及 k_{cat} 之值。

2-16-1、人類 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素對不同糖基化合物受質反應之專一性

為了瞭解人類 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素對催化糖基受質的專一性，而對不同糖類受質是否也有水解反應的催化活性，於是改變受質的糖基部分，這些受質有和 p-nitrophenyl- α -L-fucopyranoside (pNPF) 相似的糖苷化合物組成，如 p-nitrophenyl- β -D-arabinopyranoside (pNPAP)、p-nitrophenyl- α -L-arabinofuranoside (pNPAF)、p-nitrophenyl- β -D-Galactopyranoside (pNP-Gal)、p-nitrophenyl- β -D-Glucopyranoside (pNP-Glc) 和 p-nitrophenyl- β -N-acetylglucosamine (pNP-GlcNAc)，測試其受質反應的專一性。

步驟：

1. 加入濃度為 0.93 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 之純化過野生株 *h*-Fuc 酵素及不同濃度 0.25 mM~2 mM 之受質 pNPF，於 37 $^{\circ}\text{C}$ 預熱之 pH 6.8 的 50 mM 磷酸/100 mM 氯化鈉緩衝溶液，讀取波長 400 nm 吸光值的增加率，記錄其零級初始反應速率(initial velocity)。
2. 以此酵素活性之零級初始反應速率，計算求得 k_{cat} 與 K_{m} 之值。
3. 將受質 pNPF 改換成其它不同糖基化合物 pNPAP、pNPAF、pNP-Gal、pNP-Glc 和 pNP-GlcNAc，同步驟 1.讀取波長 400 nm 吸光值的零級初始反應速率，並求其 k_{cat} 與 K_{m} 之值。

2-16-2、酸鹼度對野生株與突變株之人類 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素活性 k_{cat} 、 K_{m} 影響 (pH-profile 的測定)

步驟：

1. 取不同 pH 值的緩衝溶液 Glycine/HCl (50 mM, pH 2、2.5、3)、Citric (50 mM, pH 3.5)、NaOAc (50 mM, pH 4、4.5、5、5.5)、MES (50 mM, pH 5.5、6)、 Na_2HPO_4 (50 mM, pH 6.5、6.8、7、7.5)、Hepes (50 mM, pH 7.5、8)、Tris (50 mM, pH 8)，

在 25 °C 預熱。

2. 加入濃度為 0.93 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 之純化過野生株 *h*-Fuc 酵素及不同濃度 0.5 mM~2 mM 之受質 pNPF，37 °C 下進行水解反應，以 UV 吸收光譜儀觀測波長 348 nm 吸光值的增加率，記錄其零級初始反應速率(initial velocity)。
3. 以此酵素活性之零級初始反應速率，以 Lineweaver-Burk method 雙倒數作圖計算求得 k_{cat} 與 K_{m} 之值並對 pH 值作圖，可得活性隨 pH 值變化的關係圖。
4. 將酵素換成其它純化之突變株 *h*-Fuc 酵素，重覆步驟 1.至 3.，求得 k_{cat} 與 K_{m} 之值並對 pH 值作圖。

2-16-3、野生株與突變株之人類 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素對不同非糖基受質催化活性 k_{cat} 、 K_{m} 影響 (Brønsted plot 的測定)

1. 將 pNPF 以 50 mM 磷酸緩衝溶液(pH 6.8)稀釋成各種不同濃度(0.05 mM ~2 mM)，加入濃度 0.93 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 純化之野生株 *h*-Fuc 酵素，在 37 °C 下反應，觀察 UV 波長 400 nm 的吸光值增加率，分析得反應初始速率。
2. 初始速率對 pNPF 濃度以 Michaelis-Menten equation 分析，得其 K_{m} 及 V_{max} 值。或以初始速率的倒數對受質 pNPF 濃度的倒數作圖，即雙倒數作圖法，以線性迴歸分析之而得 K_{m} 及 V_{max} 值。
3. 重複步驟 1.~2.，將 pNPF 改為各種不同受質 2,4-dinitrophenyl-fucopyranoside (DNPF，濃度為 0.02 mM-0.25 mM)、2-chloro-4-nitrophenyl-fucopyranoside (CNPF，濃度為 0.02 mM- 0.25 mM)、2-fluoro-4-nitrophenyl-fucopyranoside (FNPF，濃度為 0.02 mM- 0.5 mM)、2-methyl-4-nitrophenyl-fucopyranoside (MeNPF，濃度為 0.2 mM- 1.5 mM)、3-nitrophenyl-fucopyranoside (mPNPF，濃度為 0.5 mM- 1.2 mM)、4-cyanophenyl-fucopyranoside (pCPF，濃度為 0.1 mM- 0.5 mM)、

Phenyl-fucopyranoside (PF, 濃度為 0.1 mM- 0.5 mM), 以 UV 吸收光譜儀觀察適當波長的吸收值變化(參考附錄 II), 計算反應的初始速率(initial velocity V_0), 並以 Lineweaver-Burk method 作雙倒數圖(double reciprocal plot)求 K_m 及 k_{cat} 值。

4. 將酵素換成其它純化之突變株 *h*-Fuc 酵素, 重覆步驟 1.至 3., 求得 k_{cat} 與 K_m 之值並對受質之 pKa 值作圖。

2-17、抑制劑與酵素之抑制作用與解離常數測定

本實驗以中研院林俊宏老師提供之 *O*-hydroxyl-1-(2,3-epoxypropyl)- α -L-fucopyranoside (EPFP)來進行酵素抑制, 此類型之抑制劑通常為不可逆抑制劑, 預期在酵素活化中心, 於催化過程中與重要胺基酸殘基 (nucleophile 或 general acid/base) 產生共價鍵結, 如此, 可以直接之證據證明酵素催化反應重要胺基酸殘基之位置。

失活劑抑制作用之研究步驟:

1. 將不同的 EPFP 濃度(3.5、7、15、22.5、35 mM)與固定量純化之野生株 *h*-Fuc 酵素於 20 mM 醋酸鈉緩衝溶液(pH 5.7)中, 隨各時間點取出一定量的反應液與含固定量的 0.25 mM 反應受質 pNPF, 在 50 mM 磷酸緩衝溶液(pH 7.0)下, 以 UV 波長 400 nm 觀測其殘留的初始速率值(相對於未加 EPFP 時), 於多個時間點下, 可得數個殘留活性, 將其殘留活性曲線以 Enzfit 軟體計算出其一級失活反應速率常數 k_{obs} 值 (單位為 s^{-1})。
2. 依照上法, 由 5 個不同的 EPFP 濃度, 可得 5 個一級失活反應速率常數 k_{obs} 值。
3. 將 5 個 k_{obs} 的倒數與 EPFP 濃度的倒數, 以線性迴歸($y = ax + b$)作圖, 可以得到 EPFP 對野生株 *h*-Fuc 酵素的失活速率(k_i)及失活平衡常數(K_i)。
4. 另外, 製備一相同反應條件之酵素與抑制劑混合樣品, 待步驟 1.~ 4.活性追蹤實驗結束, 利用液相串聯質譜儀(LC/MS/MS)偵測蛋白質反應後分子量的變化。

解離常數測定之步驟：

1. 以 0.25 mM 之 pNPF 反應受質，不加抑制劑的活性測試系統於標準系統(50 mM 磷酸緩衝溶液，pH 6.8，37 °C)下進行測試，此系統的活性定義為未加抑制劑之活性標準值。
2. 分別變換不同濃度(0.25~2 mM)的抑制劑(δ -Fuconolactone)，求得酵素於不同抑制劑濃度下的活性。
3. 將各抑制劑濃度下的活性除以未加抑制劑之活性標準值得到一比值為 γ 值，將 γ 值經適當運算，與抑制劑濃度(雙倒數作圖法)，斜率即 K_i 值。
4. 將抑制劑改為其他物種(L-Fucose、1-O-Methyl- α -L-Fucose)，以相同方法得到其他抑制劑的 K_i 值。

2-18、陰離子親核劑對人類 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素活性的影響



1. 將不同陰離子親核劑配置成不同濃度 50~3000 mM，於 pH 6.8 的 50 mM 磷酸緩衝溶液。
2. 在 $[S] \gg K_m$ 的情形下，取固定量純化過的野生株和突變株 E289G/Q 酵素 10 μ l (濃度 0.93~1.14 μ g/ μ l) 加入不同濃度之陰離子親核劑及反應受質 CNPF、FNPF 和 pNPF (濃度為 0.5~2.5 mM)，在 37 °C 觀察波長 400 nm 的吸光值增加率，分析其反應初始速率(即 k_{cat} 值)。
3. 以相同量之 pNPF 和酵素反應所得之初始速率為標準值，比較各個不同陰離子親核劑對酵素活性的影響。
4. 由於疊氮可以增加突變酵素之 k_{cat} 值到 24 倍，所以我們選擇以 0.5 M 疊氮對突變株 E289Q 酵素，在不同酸鹼度緩衝溶液下對受質 pNPF 進行酵素水解反應。進一步了解疊氮在酵素活性復活反應機制中所扮演的角色，作法請參考**章節 2-16-2**。

2-19、利用 $^1\text{H-NMR}$ 觀測突變株酵素以化學復活反應後之疊氮-岩藻糖產物

突變株 D225G 酵素與疊氮的作用反應：

步驟：

1. 製備含 1.5 M sodium azide (疊氮鈉) 之 50 mM 磷酸緩衝溶液(pH 6.5)，再以此緩衝溶液配製 80 mM 之反應受質 FNPF 溶液。
2. 將純化之突變株 D225G 酵素(濃度 1.69 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)，加入步驟 1. 所配製之反應受質溶液。
3. 取出微量之反應溶液，以 TLC 觀測受質 FNPF 的反應，藉以判定受質 FNPF 是否反應完。
4. 將步驟 3. 之反應溶液，加入除水過之吡啶(5 mL)，蓋血清塞、插上氮氣球，並放置冰浴 15 分鐘。
5. 取醋酸酐 10 ml，慢慢的滴入反應瓶中，加完醋酸後，移開冰浴，反應 overnight。
6. 以 TLC 確認反應起始物皆已消失，則中止反應。減壓抽氣，濃縮至黏稠狀。以二氯甲烷(dichloromethane, DCM)當作溶劑，以水萃取兩次，再以飽和碳酸氫鈉水溶液以及飽和食鹽水萃取；並合併有機層，加入無水硫酸鎂(MgSO_4)除水，減壓抽氣濃縮至黏稠狀。
7. 以沖提液 Hexane/EA=9/1 到 Hexane/EA=7/3 的極性梯度，進行管柱層析法純化，並減壓抽氣濃縮至乾。
8. 取步驟 7. 之產物以 D-二氯甲烷回溶，後放入 NMR 管中，進行 $^1\text{H-NMR}$ 掃瞄。
9. 由所得圖譜中，觀察反應產物之化學位移(chemical shift)，以分析此突變株 D225G 酵素之化學活性復活。

突變株 E289G 酵素與疊氮的作用反應：

步驟：

1. 以 D₂O 製備含 1.5 M sodium azide (疊氮鈉)之 5 mM 磷酸緩衝溶液(pD 6.8)，再以此緩衝溶液配製 7.5 mM 的反應受質 CNPF 溶液。
2. 將適量突變株 E289G 酵素(濃度 1.4 μg/μl)，並由水溶液置換為步驟 1.緩衝溶液。
3. 取出適量不含水的酵素溶液，偵測對受質 CNPF 的活性，用以判定 NMR 反應中所使用受質濃度與活性。
4. 取 0.5 ml 步驟 1.之受質 CNPF 溶液放入 NMR 管中，以此為對照組。
5. 加入 0.1 ml 步驟 2.之酵素，開始觀測反應之進行。在 0 ~ 300 分鐘之間的各時間點，掃瞄觀測反應作用的進行程度
6. 由所得圖譜中，觀察反應產物之化學位移與各分裂吸收峰(chemical shift)的消長變化，以分析此突變株 E289G 酵素以化學活性復活對受質之催化立體特異性。



2-20、化學復活法下突變株 E289G 酵素對不同芳香族離去基團

受質之反應性

由於疊氮可以增加突變酵素之 k_{cat} 值到 24 倍，所以我們選擇 0.5 M 疊氮對具有不同離去基能力的 aryl-fucopyranosides 進行酵素水解反應。希望進一步了解疊氮在酵素反應機制中所扮演的角色。

1. 將上述不同芳香族離去基團之受質(CNPF、FNPF、pNPF、MeNPF、mPNPF、pCPF 及 PF)，以含 500 mM 疊氮的 50 mM 磷酸緩衝溶液(pH 6.8) 稀釋成各種不同的濃度 (0.5 mM~2.5 mM)，加入固定量純化之突變株 E289G 酵素，在 37 °C 觀察波長 400 nm 的吸光值增加率，分析得其反應初始速率。

2. 以酵素對各個受質的反應初始速率對受質濃度做圖，以 Lineweaver-Burk method 雙倒數作圖分析，可求得酵素對不同受質的 K_m 及 V_{max} 值(即 k_{cat} 值)。
3. 以 $\log k_{cat}$ 或 $\log k_{cat}/K_m$ ($k_{cat} = V_{max}/[E]_t$) 對受質離去基的 pK_a 做圖，可得 Brønsted plot。

2-21、CD (circular dichroism)光譜觀測野生株和突變株之二級結構

生物基礎分子一般都具有手性，也都具有光學活性。手性分子都具有光學活性，當單色左旋(AL)與右旋(AR)的圓偏振光通過某一種手性樣品時，該樣品對左、右旋圓偏振光的吸收不同，這叫做圓二色性。其差值 $\Delta A = \Delta AL - \Delta AR$ 稱為圓二色值，按波長掃描就得到了圓二色譜(CD 光譜)。藉此儀器判定蛋白質二級結構是否因定點突變而改變否。



方法：

1. 我們利用 Jasco J-815 圓二色性極譜儀，觀測野生株與各突變株 *h*-Fuc 酵素的圓二色光譜(波長：200~250 nm)，使用的酵素濃度為 25~30 μM ，所有的光譜皆以磷酸緩衝溶液(1 mM, pH 7.0)的背景值校正過，每一蛋白質樣品之光譜實驗為偵測掃描 16 次的平均。
2. 每次所得光譜的數據以 ellipticity (Θ)來表示，最後作圖時換算成平均殘基莫爾之 ellipticity ($[\Theta]_{MRW}$)。

$$[\Theta]_{MRW} = \Theta / (10 * C_r * l) \quad C_r = (n * 1000 * c_g) / M_r$$

Θ 為 ellipticity in mdeg, C_r 為平均殘基之莫爾濃度, l 為偵測使用石英瓶的內徑寬度, n 為蛋白質的 peptide bond 總數, c_g 為所偵測的蛋白質濃度(g/mL), M_r 為所偵測的蛋白質分子量, $[\Theta]$ 的單位表示法為 $\text{deg} * \text{cm}^2 * \text{decimole}^{-1}$

2-22、蛋白質序列比對與二級結構分析

此部分的蛋白質結構模擬與二級結構比對分析，由清大張承文博士共同合作。首先，於糖苷水解酵素家族 GH-29 中，以 *Thermotoga maritima* (Tm-Fuc，Q9WYE2，PDB：1ODU) 為結構模擬的基礎模板來源，利用 Swiss-Model server (<http://swissmodel.expasy.org/>)，建立人類 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素之 3D-CPHmodel 蛋白結構模擬。再從 CAZy 資料庫 (<http://www.cazy.org/>) 中，搜尋家族 GH-29 中其他不同生物來源的 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素之蛋白質序列，並配合 InterPro 資料庫 (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>) 選擇 酵素 催化中心結構為 $(\alpha/\beta)_8$ 結構區域 (又名 TIM-barrel domain, IPR017853) 的蛋白質組成序列來進行比對，其包括有：*Halocynthia roretzi* (Q8TA71，Hr-Fuc)、*Schistosoma japonicum* (Q86FH9，Sj-Fuc)、*Pongo abelii* (Q5RFI5，Pa-Fuc)、*Drosophila melanogaster* (Q9VTJ4，Dm-Fuc)、*Caenorhabditis elegans* (P49713，Ce-Fuc)、*Dictyostelium discoideum* (P10901，Dd-Fuc)，彼此與 *h*-Fuc 序列相似度高達 70 % 以上。隨後將這些生物來源之 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素所選擇的胺基酸區段序列，包括：Tm-Fuc：7-356、*h*-Fuc：31-365、Hr-Fuc：55-392、Sj-Fuc：33-369、Pa-Fuc：31-366、Dm-Fuc：33-368、Ce-Fuc：17-350、Dd-Fuc：20-361 送到 PSIPRE 二級結構的分析預報網站 (<http://zeus.cs.vu.nl/programs/pralinewww/>)，分析預測各蛋白質序列之二級結構。並藉由預測的二級結構，利用 Combinatorial Extension (CE) 方法，以兩 C_α - C_α 彼此距離小於 20 Å 為原則，協助找尋 *h*-Fuc 序列中與 Tm-Fuc 彼此相對應之重要催化殘基位置。

第三章 結果與討論

3-1、建構重組人類 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素之表現系統

於人類蛋白質體中之 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素，呈現多形性，有著三型同功酶，即:Fuc_1，Fuc_2-1，Fuc_2。最主要的活性來源有兩個，分別為位於人體肝組織細胞與血液漿細胞。在人類肝組織細胞之成熟型態 α -L-岩藻糖苷水解酵素(Fuc_1)，由439個胺基酸所組成的醣蛋白。對於真核或高等動植物之酵素，往往因蛋白質表面上有糖基化合物修飾著，不易於原核大腸桿菌系統中表現蛋白質；雖然過去的文獻報導中，曾有學者利用原核表現載體 pGEX-2T，將此酵素基因與攜帶蛋白 Glutathione S-transferase(GST)結合為融合蛋白質(fusion protein)，並於大腸桿菌中過量表現，其結果所得表現之蛋白質為包涵體(inclusion bodies)⁽⁹¹⁾。所以，為了使人類 α -L-岩藻糖苷水解酵素可於大腸桿菌表現系統中表現，我們利用大腸桿菌鹼基-胺基酸轉譯密碼表，檢視此 α -L-岩藻糖苷水解酵素之基因鹼基密碼，是否於大腸桿菌系統中為高轉譯頻率之胺基酸(完整基因序列請見附錄III)?結果發現鹼基密碼有高達90 %以上的轉譯頻率。因此，將嘗試利用本實驗室之大腸桿菌表達系統載體如：pRSET_A、pET系統…等，以DNA分子生物剪接技術，於大腸桿菌BL21(DE3)中表現酵素活性，經過篩選、活性測試，成功的於pET22b(+)載體中表現出人類 α -L-岩藻糖苷水解酵素活性。

首先，利用質體抽取管柱從大腸桿菌 JM-109中，抽取含有人類 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素基因之pCMV質體，以設計含有NdeI和HindIII兩限制酶水解鹼基序列之寡核苷酸模板引子，利用PCR技術放大人類 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素基因。另外，因所設計的寡核苷酸模板引子，當於進行基因的放大反應，同時也會將此人類 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素基因的訊號勝肽(MRSRPAGPALLLLLLFLGAAES)除去，並於此成熟酵素蛋白質N端的放大基因加上一ATG(胺基酸Met)的"開始"轉譯鹼基密碼(見圖3-1所示)。所得PCR產物以NdeI和HindIII兩限制酶水解，並利用膠回收法，取得此酵素基因片段約1,400bp，以T4接合酶和以相同限制酶水解之表現質體 pET22b(+)彼此相接合，後轉殖於大腸桿菌BL21(DE3)中表現蛋白質，見圖3-2所示之示意圖和步驟。

<i>h</i> -Fuc	-----MVRRAQPPRRYTPDWPSLDSRPLPAWFDEAKFGVFIHWG
AAA52481	MRSRPAGPALLLLLLFLGAAESVRRRAQPPRRYTPDWPSLDSRPLPAWFDEAKFGVFIHWG
<i>h</i> -Fuc	VFSVPAWGSEWFWWWQGEGRPQYQRFMRDNYPPGFSYADFGPQFTARFFHPPEEWADLFQ
AAA52481	VFSVPAWGSEWFWWWQGEGRPQYQRFMRDNYPPGFSYADFGPQFTARFFHPPEEWADLFQ
<i>h</i> -Fuc	AAGAKYVVLTTKHHEGFTNWSPVSWNWNSKDVGPHRDLVGELGTALRKRNIIRYGLYHSL
AAA52481	AAGAKYVVLTTKHHEGFTNWSPVSWNWNSKDVGPHRDLVGELGTALRKRNIIRYGLYHSL
<i>h</i> -Fuc	LEWFHPLYLLDKKNGFKTQHFVSAKTMPELYDLVNSYKPDLIWSDGEWECPTYWNSTNF
AAA52481	LEWFHPLYLLDKKNGFKTQHFVSAKTMPELYDLVNSYKPDLIWSDGEWECPTYWNSTNF
<i>h</i> -Fuc	LSWLYNDSPVKDEVVVNDRWGQNCCHGGYNCEDKFKPQSLPDHKWEMCTSIDKFSWG
AAA52481	LSWLYNDSPVKDEVVVNDRWGQNCCHGGYNCEDKFKPQSLPDHKWEMCTSIDKFSWG
<i>h</i> -Fuc	YRRDMALSDVTEESEIISELVQTVSLGGNYLLNIGPTKDGLIVPIFQERLLAVGWLSIN
AAA52481	YRRDMALSDVTEESEIISELVQTVSLGGNYLLNIGPTKDGLIVPIFQERLLAVGWLSIN
<i>h</i> -Fuc	GEAIYASKPWRVQWEKNTTSVWYTSKGSAVYAIFLHWPENGLNLESPITTSTTKITMLG
AAA52481	GEAIYASKPWRVQWEKNTTSVWYTSKGSAVYAIFLHWPENGLNLESPITTSTTKITMLG
<i>h</i> -Fuc	IQGDLKWSTDPDKGLFISLPQLPPSAVPAEFAWTIKLTGVK-
AAA52481	IQGDLKWSTDPDKGLFISLPQLPPSAVPAEFAWTIKLTGVK-

圖 3-1、重組 *h*-Fuc 與人類原生肝細胞組織 Fuc(NCBI:AAA52481)之蛋白質序列比較。

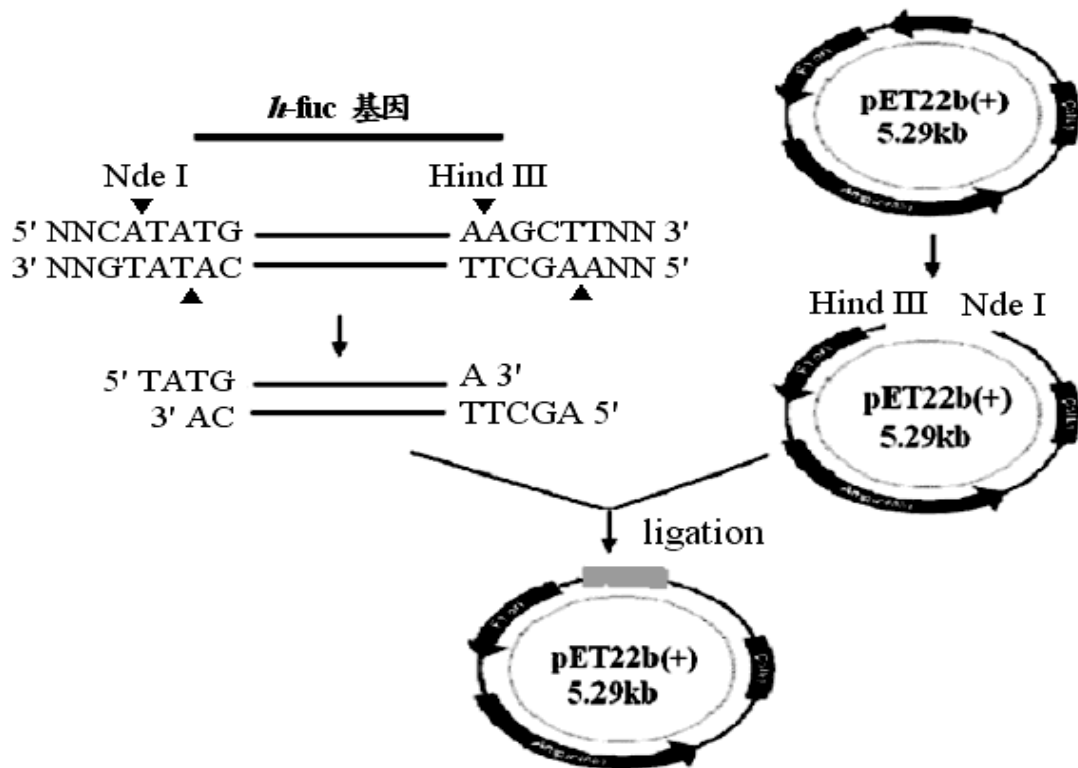


圖 3-2、表現載體 pET22b(+)與人類 *h*-Fuc 基因剪接步驟示意圖。

3-2、重組人類 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素的誘導

以 PCR 篩選，確定表現宿主細胞大腸桿菌 BL21(DE3)中，*h*-Fuc 基因存在與否後，以此系統檢視蛋白質的成長與活性曲線。pET22b(+)表現系統主要是藉由 *lacZ* 的啟動子，以 IPTG 誘導增加基因的蛋白質轉譯，使蛋白質能過量的表現。 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素為一酸性蛋白質，所適合的活性 pH 值在 4.0~6.0。建構酵素的表現系統中，發現在菌體的培養過程中，培養基之 pH 值對菌體生產酵素的活性與量有所影響。挑單菌落到 5 mL 的 LBA 液體培養基中，培養至 OD₆₀₀ 約 0.6~0.8 後，將其分別轉至各 1 L 不同 pH 值 4.0~8.0 之 LBA (含 2 mM IPTG) 液體培養基中，進行菌體成長培養與酵素活性之檢測追蹤。在培養的過程中隨時間定量的取樣，偵測菌體成長密度之 OD₆₀₀ 吸收值 (見圖 3-3_A 所示);並以超音波震破菌體取其胞內酵素，與受質 pNPF 作用反應，觀測 UV 波長 400 nm 之吸收值反應速率變化，(見圖 3-3_B)。當在 pH 值 6.0 之培養基中，酵素的催化活性為佳;同時，培養至 24~30 小時，菌體成長密度與酵素活性達至一穩定狀態。因此，往後在酵素的誘導與培養上以 pH 值 6.0 為佳，後進行菌體之收集，並利用超音波震破取得內粗提液，作酵素純化。

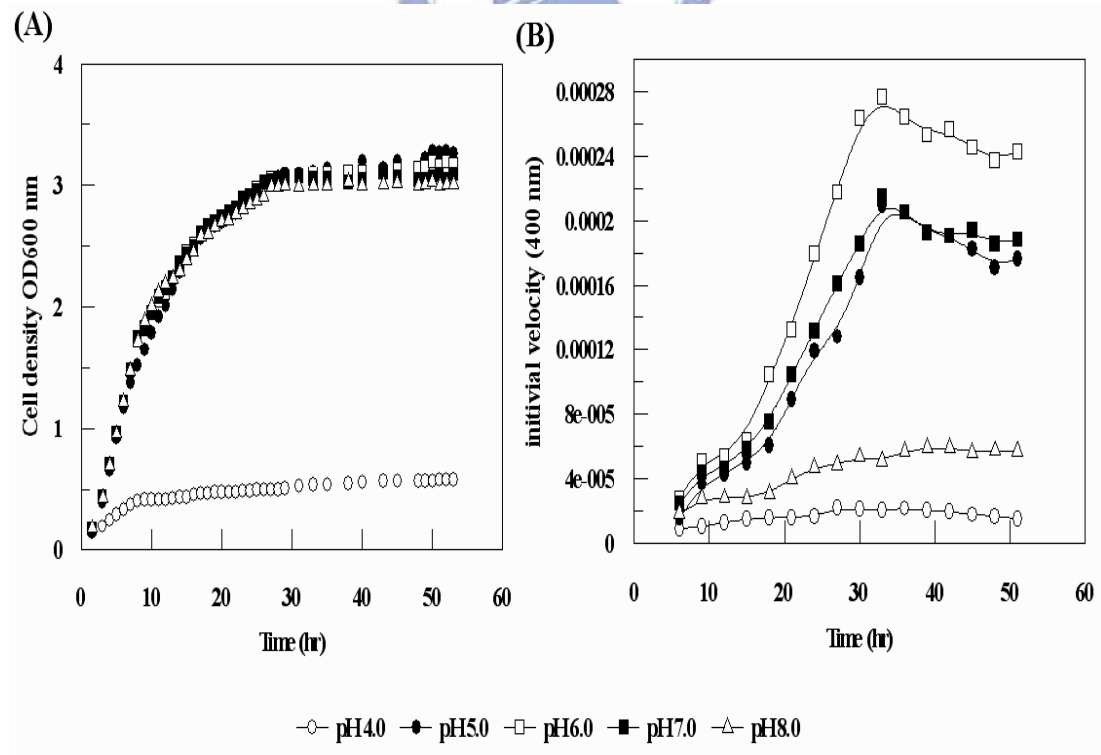


圖 3-3、重組 *h*-Fuc 酵素於大腸桿菌 BL21(DE3)之成長表現與活性曲線。

3-3、重組人類 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素的純化

人類 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素的純化，包含了野生株及所有的各定點突變株酵素，為了避免交叉污染的問題，每一株酵素皆以新的離子層析管柱純化。首先，自含有重組人類岩藻糖水解糖苷酵素基因的大腸桿菌 BL21(DE3) 中，提取新鮮的細胞萃取液。

我們首先以 HiTrap SP 陽離子交換樹脂管柱在 pH 5.5 之醋酸鈉緩衝溶液下進行酵素純化分離。由 HiTrap SP 的層析圖(圖 3-4_A)顯示，在溶液 pH 5.5 之條件下，人類 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素在管柱中會被滯留，而此滯留作用必須以至少 500~700 mM 的氯化鈉濃度才能消除，將蛋白質沖洗下來，收集具有 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素活性的流分；濃縮、除鹽後，以 HiTrap Q 陰離子交換樹脂管柱在 pH 6.2 之磷酸緩衝溶液下進行第二次酵素分離，而酵素活性於鹽類梯度 250~350 mM 的區間被偵測(見圖 3-4_B)，收集具有 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素活性的流分；再次濃縮、除鹽後，以凝膠樹脂 G-75 管柱在流速 0.70 ml/min，pH 5.7 的醋酸鈉緩衝溶液下，進行第三次酵素層析分離，其活性之偵測層析圖(見圖 3-4_C)。最後，收集具有 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素活性的流分，經 SDS-PAGE 分析其純度(見圖 3-5_A)，顯示其純度已達到 95 % 以上。

統整全部的純化過程，將純化過程及各純化步驟的純化倍數、回收率制成一純化倍率表，(見表 3-1 所示)。

表 3-1、重組蛋白質 *h*-Fuc 酵素之純化倍率表。

Step	Total Protein (mg)	Total Activity (units)	Specific Activity (units/mg)	Purity Fold	Yield (%)
Crude enzyme extract*	102	651	6.4	1	100
HiTrap SP (pH 5.5)	34.8	342	9.8	1.5	34
HiTrap Q (pH 6.2)	6.7	266	39.7	6.2	20
Superdex G-75 (pH 5.7)	0.34	72	211.7	33.1	5.1

* 為 20 % ~ 85 % 銨鹽沉澱的 Crude enzyme extract 蛋白質溶液。

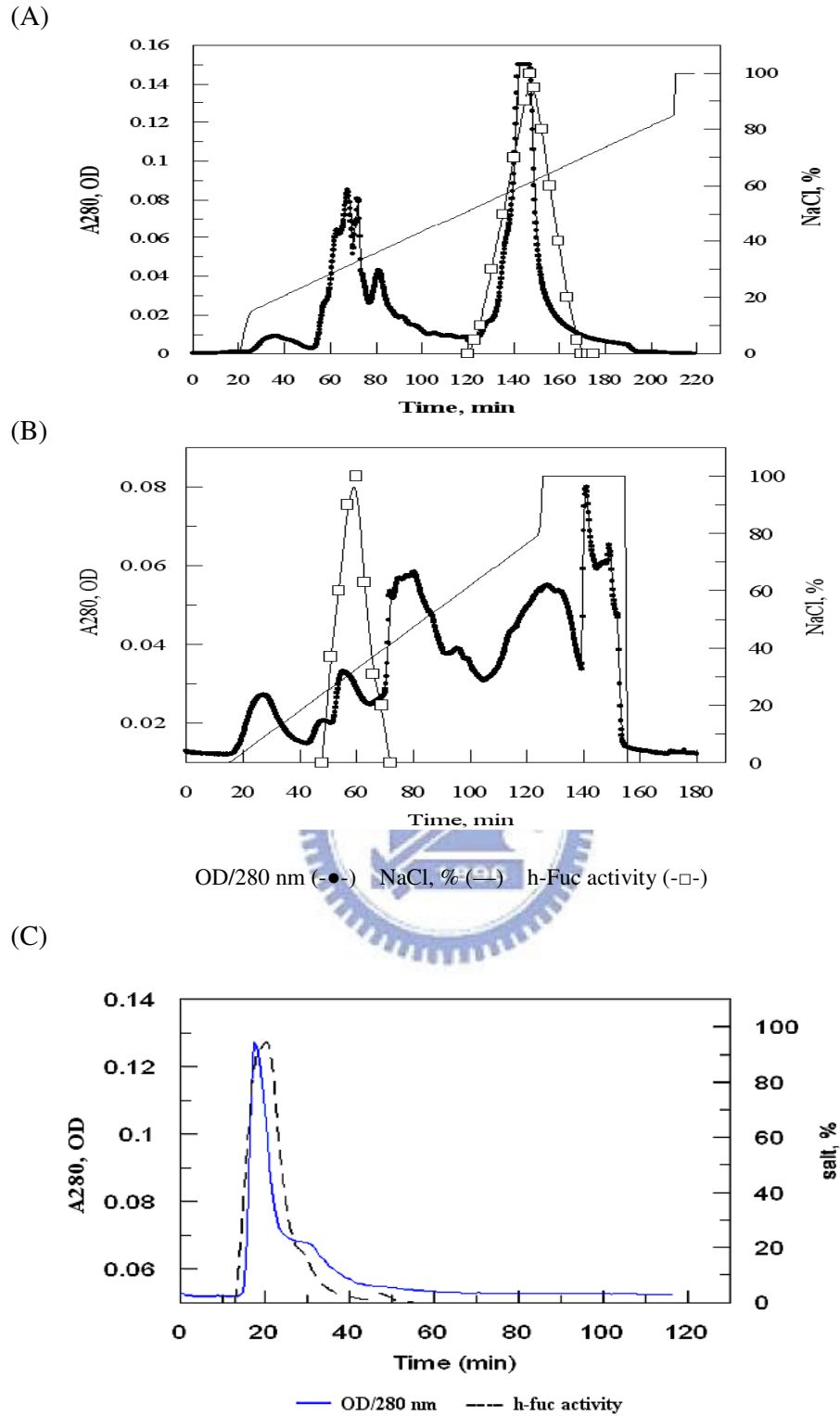


圖 3-4、野生株 *h-Fuc* 酵素之各步驟離子交換樹脂層析結果圖。

- (A) HiTrap SP 陽離子交換樹脂管柱層析 (B) HiTrap Q 陰離子交換樹脂管柱層析
 (C) 凝膠樹脂 G-75 管柱層析

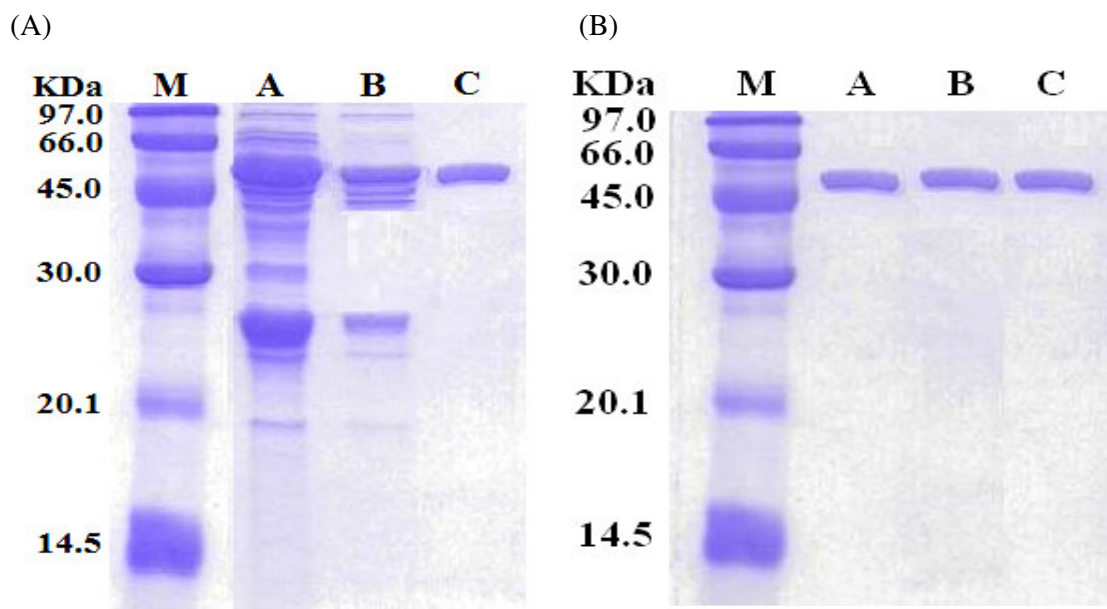


圖 3-5、重組蛋白 *h-Fuc* 酵素之 SDS-PAGE。

(A) lane M : protein marker (14.5-97 kDa)

lane A : 過 SP 陽離子交換樹脂管柱之野生株 *h-Fuc*。

lane B : 過 Q 陰離子交換樹脂管柱之野生株 *h-Fuc*。

lane C : 凝膠樹酯 G-75 管柱層析之野生株 *h-Fuc*。

(B) lane M : protein marker (14.5-97 kDa)

lane A : 純化過後之突變株 E79G *h-Fuc*。

lane B : 純化過後之突變株 D225G *h-Fuc* (含 6-His 胜肽區域)。

lane C : 純化過後之突變株 E289G *h-Fuc* (含 6-His 胜肽區域)。

3-4、重組人類 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素的性質

3-4-1、蛋白質的分子量

將純化且除鹽之重組人類 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素，以 SDS-PAGE 所呈現出酵素分子量約 50 KDa，利用 Q-TOF LC/MS 分析此酵素分子量。由質譜分析可知，主要的蛋白質分子量為 50895.0 Da (見圖 3-6)，而利用 Vector NTI 軟體分析 (見表 3-2) 所得之分子量為 51028.5 Da，兩者之差距約 133 Da，其所得數據差值為此重組人類岩藻糖水解糖苷酵素中，蛋白質 N 端的轉譯胺基酸 Met (M.W.= 131 Da) 被刪除的分子量訊號。推測是蛋白質於表現系統轉譯時，為甲基硫胺基酸蛋白酶所切除。而此現象於本實驗室其他研究亦發生，整體的蛋白質分子量與結構活性無受影響，此純化酵素將被用來作後續的酵素動力學之研究。

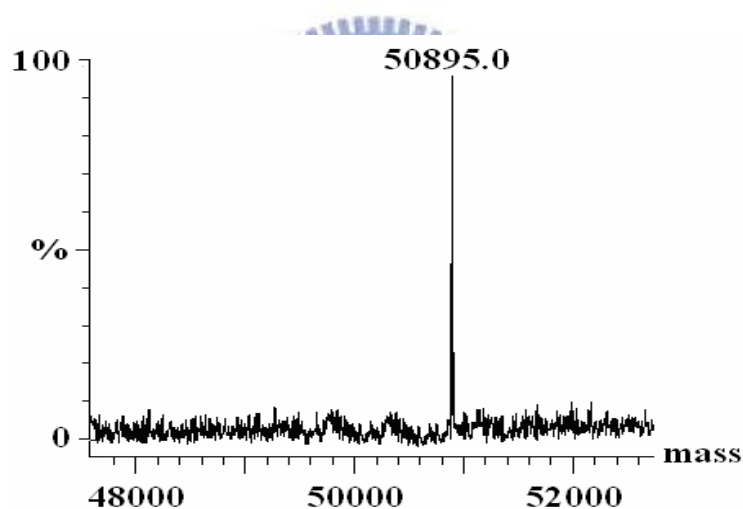


圖 3-6、重組蛋白 *h*-Fuc 酵素分子量之質譜分析圖。

Analysis	Entire Protein
Length	439 aa
Molecular Weight	51028.5 m.w.
1 microgram =	19.655 pMoles
Molar Extinction coefficient	178430
1 A[280] corr. to	0.29 mg/ml
A[280] of 1 mg/ml	3.51 AU
Isoelectric Point	6.03
Charge at pH 7	-5.09

表 3-2、以 Vector NTI 軟體分析重組之 *h*-Fuc 酵素分子量和性質

3-4-2、蛋白質濃度的決定

蛋白質濃度的決定有很多種方法，常見到的有 Bradford Assay、Lowry Assay、UV 吸光法、BCA Assay 等方法，而精確的蛋白質濃度測定是蛋白質化學中極困難的工作。本實驗使用 Bicinchoninic Acid (BCA) Assay，利用不同濃度的蛋白質標準品對其經 BCA 方法作用之 OD₅₆₂ 吸收值作圖，可得一標準檢量線 ($Y = aX + b$) (請參閱附錄 IV 之圖所示)。將預測濃度的蛋白質依相同方法處理，得其 OD₅₆₂ 之值再配合 UV 280 nm 吸收的結果，則可知道 1 OD₂₈₀ 等於多少 $\mu\text{g} / \mu\text{L}$ ，所以往後只要測得 OD₂₈₀ 的值就可以求得蛋白質的濃度。

本實驗所用的標準品為 BSA (標準牛血清蛋白)，其濃度為 $1 \mu\text{g} / \mu\text{L}$ ，所預測之 *h*-Fuc 蛋白質 ($10 \mu\text{L}$) 經 BCA 測試得 OD₅₆₂ 等於 0.71，代入檢量線換算後得 $1.63 \mu\text{g} / \mu\text{L}$ ，而 OD₂₈₀ 值為 1.42 OD，故可得蛋白質 $1 \text{ OD}_{280} = 1.16 \mu\text{g} / \mu\text{L}$ ，往後所有的蛋白質濃度皆以此為標準。



3-5、人類 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素之蛋白質特性與催化性質討論

酵素穩定性是動力學研究上的一項主要變因，而影響酵素穩定性有許多，主要是溶液的酸鹼度和溫度。若酵素穩定性之變因存在於動力學之數據中，將使該數據難以分析，甚而沒有意義。例如於 pH - profile 之測定上，酵素活性之變化常因 pH 值而改變。而此等活性之變化，常包含結構與酸鹼度之因素。因此了解酵素的穩定性，進而有效簡化活性變化的變因，才能真正反應出酵素活性與 pH 之關係。以下實驗將就酸鹼度與溫度之因素對酵素穩定度進行研究。

3-5-1、酸鹼度對人類 α -L-岩藻糖水解釋糖苷酵素反應活性的影響

為了解酸鹼度對人類 α -L-岩藻糖水解釋糖苷酵素催化活性的效應，將純化過之野生株 *h*-Fuc 酵素與受質置於不同酸鹼值的緩衝液中進行反應。緩衝溶液及其酸鹼值為: Glycine/HCl (50 mM, pH 2、2.5、3)、Citric (50 mM, pH 3.5)、NaOAc (50 mM, pH 4、4.5、5、5.5)、MES (50 mM, pH 5.5、6)、MES (50 mM, pH 6.5、7、7.5)、Hepes (50 mM, pH 7.5、8)、Tris (50 mM, pH 8、8.5)、Glycine/NaOH (50mM, pH 9、9.5、10)、Caps (50mM, pH 10、10.5)，與 0.25 mM 受質 pNPF，在 37 °C 下，以 UV 波長 400 nm 偵測其吸收值變化，觀測野生株 *h*-Fuc 酵素在各不同 pH 值緩衝液之初始反應速率。發現酵素的反應活性，在不同 pH 值下呈現一近似典型的鐘型區線(見圖 3-7)，其最佳的反應在 pH 3.5~5.5 的緩衝液；隨緩衝溶液 pH 值之增加或降低時，酵素反應活性漸下降，當緩衝液 pH 值高於 pH 8.0 時，酵素幾近為無活性反應。

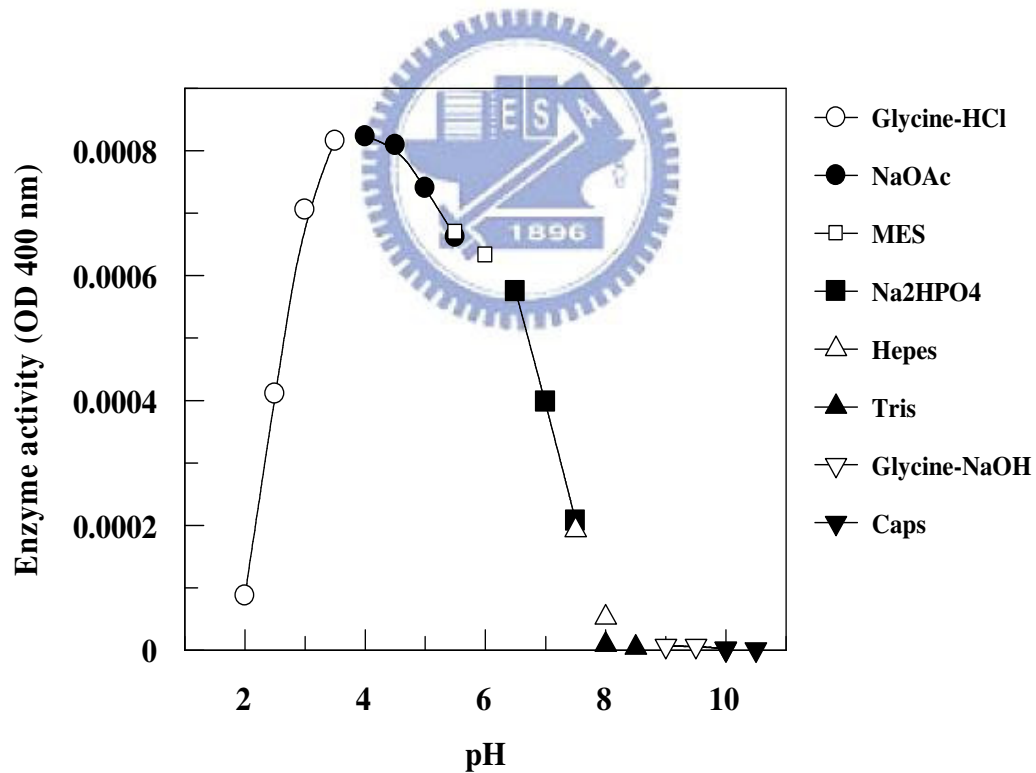


圖 3-7、酸鹼度對野生株 *h*-Fuc 酵素反應活性的影響。

3-5-2、酸鹼度對人類 α -L-岩藻糖水解酵素穩定性的影響

圖 3-9 顯示為野生株 *h*-Fuc 酵素在 25 °C 下，存放於不同酸鹼值的溶液中，隨後定量取出於同一個適當的 pH 值的磷酸緩衝溶液(50 mM, pH 7.0)下，以 0.25 mM 受質 pNPF，在 37 °C 下，以 UV 波長 400 nm 偵測其吸收值變化，觀測酵素存在各不同 pH 值緩衝溶液中，所得個反應時間點之初始反應速率的殘餘活性比例變化圖。其殘餘活性比例(residual activity ratio)的定義是以 25 °C，酵素存放於 pH 5.7 緩衝溶液的第一個時間點為參考值而得，由圖 3-8 可看出在 25 °C 時，4 小時之內，從 pH 3.0 到 pH 6.0 之間酵素可以維持 95 % 以上的穩定度；而於 pH 2.5 和 pH 7.0 時，酵素仍可維持 70 %~85 % 之間的穩定度，但當高於 pH 8.0 以上，酵素活性急遽下降。可推測人類岩藻糖水解糖苷酵素，偏屬於一嗜酸性的蛋白質，於反應 pH 值 3.0 至 6.0 的溶液呈現一較佳的結構與反應活性。

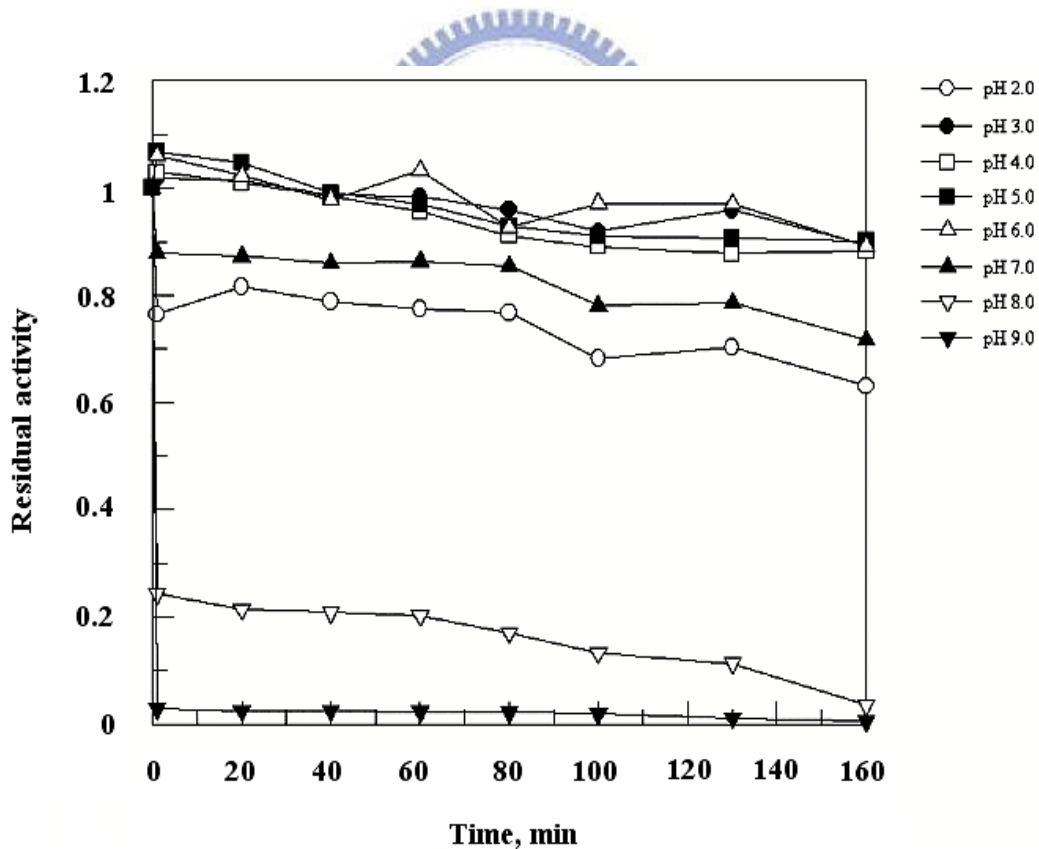


圖 3-8、在 25 °C 中，酸鹼度對野生株 *h*-Fuc 酵素穩定性的影響。

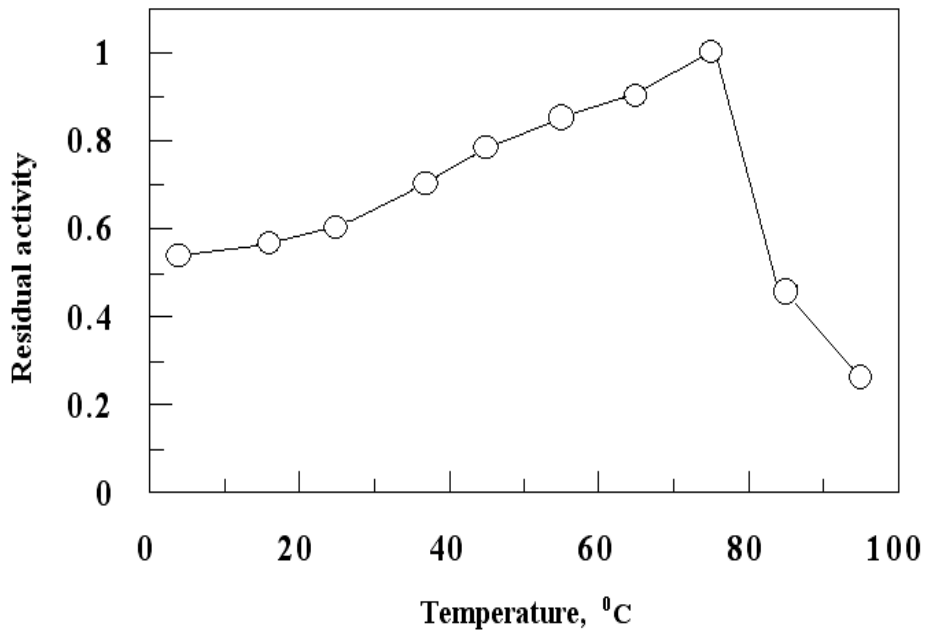
3-5-3、溫度對人類 α -L-岩藻糖水解酵素活性的影響

對酵素反應活性測量，會隨著不同溫度改變下，影響酵素催化的結果。為了解此效應，取純化之野生株 *h*-Fuc 酵素分別置於 4、16、25、37、45、55、65、75、85 和 95 °C 等不同溫度的 50 mM 磷酸緩衝溶液(pH 7.0)下，與 0.25 mM 受質 pNPF 進行水解反應，觀測 UV 波長 400 nm 之吸收值變化，所得初始反應速率與溫度關係（見圖 3-9_A 所示）。由該圖可以看出當逐漸升高反應溫度時，可發現野生株 *h*-Fuc 酵素反應催化活性也隨之上升；但是當反應溫度升高至溫度 75 °C 以上時，酵素在反應時間之內的活性逐漸遞減。可知在超過 75 °C 以上的反應溫度下，酵素的結構與催化反應被受破壞或影響，進而降低其催化活性。因此，所得酵素最佳反應溫度為 65 °C ~70 °C。該圖所用之野生株 *h*-Fuc 酵素催化水解受質 pNPF 的活性參考點，設其值為 1。

3-5-4、人類 α -L-岩藻糖水解酵素的熱穩定性

圖 3-9_B 顯示為純化之野生株 *h*-Fuc 酵素存放於不同溫度 25 °C ~ 75 °C 之期間，酵素催化活性穩定度的比較。隨時間定量取樣，以 0.25 mM 受質 pNPF，在 37 °C、50 mM 磷酸緩衝溶液(pH 7.0)下進行水解反應，觀測 UV 波長 400 nm 之吸收值變化所得初始反應速率。殘餘活性比例的定義是以存放在 4 °C 中純化之野生株 *h*-Fuc 酵素，催化水解受質 pNPF 所測得之初始反應速率為參考點；隨後觀測野生株 *h*-Fuc 酵素存放在不同溫度中，所得各反應時間點的催化初始反應速率，再除以參考點而得的殘餘比例。由該圖可知，當野生株 *h*-Fuc 酵素存放於不同溫度 4 小時之內，在溫度 25 °C ~ 55 °C 之間活性並不會隨著溫度的改變而有明顯的變化，其酵素的穩定度相當好。但當人類岩藻糖水解糖苷酵素存放溫度高於 60 °C 以上時，酵素催化活性則隨著存放時間的增加而有降低之趨勢，表示溫度高於 60 °C 以上已使酵素結構變的不穩定，進而降低催化作用之活性，使酵素無法維持正常之穩定性。

(A)



(B)

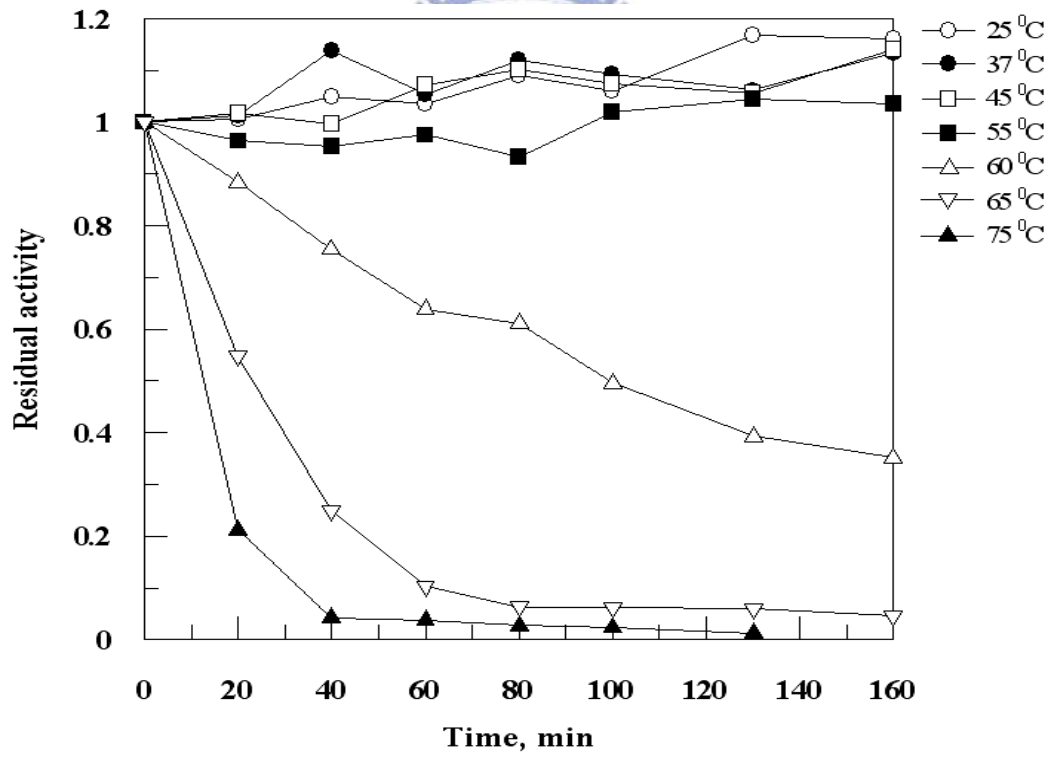


圖 3-9、溫度對野生株 *h*-Fuc 酵素反應活性與穩定度的影響。

(A) 不同溫度對酵素催化活性的影響。

(B) 酵素存放不同溫度下對穩定度的影響。

3-5-5、金屬離子及試劑對人類 α -L-岩藻糖水解酵素活性的影響

一般的酵素在活性中心(active site)處可能會有一個至多個金屬離子，這些金屬離子可在酵素催化反應中，利用配位鍵結的方式幫助酵素作用，使受質與酵素分子更容易進行反應，此類酵素稱作 metalloenzyme。

若酵素是 metalloenzyme，且其金屬離子並非共價性鍵結於酵素中，當在純化酵素的過程中，金屬離子可能被釋放出，而影響酵素之活性，因此，當於反應的緩衝液中，加入適量濃度之金屬離子，有助於恢復酵素之催化活性。在 37⁰C 下，將已純化之野生株 *h*-Fuc 酵素與 0.25 mM 受質 pNPF，置於含 5 mM 之各金屬離子溶液中，分析其反應初始速率的變化，由表 3-3 的相對活性觀測金屬離子對重組 *h*-Fuc 酵素作用影響，發現在二價過渡金屬離子中除了 Hg²⁺離子，都略增加對重組 *h*-Fuc 酵素的催化活性反應速率；其它在二價鹼金屬離子方面，對酵素的催化活性速率雖有微弱下降但也都在 90 % 以上。雖無 *h*-Fuc 之晶體結構可鑑定有否鍵結金屬存在，但可見過渡金屬對催化反應上有所助益。重金屬 Hg²⁺離子、DTT 和還原試劑 2-mercaptoethanol 等，對於野生株 *h*-Fuc 酵素則有完全的抑制作用，推測是破壞酵素結構中雙硫鍵或與酵素內自由的 Cys 胺基酸之硫鍵結作用，使得酵素失去原有催化作用。對此項推論觀點，於本實驗室過去對此 *h*-Fuc 酵素的抑制劑藥物篩選研究中，確切發現一些抑制劑藥物與 *h*-Fuc 酵素內自由的 Cys 胺基酸有鍵結反應⁽⁹²⁾，進而使酵素失去催化活性。

表 3-3、金屬離子及試劑對野生株 *h*-Fuc 酵素活性的影響。

金屬離子	相對活性 % *	金屬離子	相對活性 %	金屬離子	相對活性 %
None	100 %	Hg ²⁺	0.7 %	Pb ²⁺	104 %
Cu ²⁺	103 %	Co ²⁺	109 %	EDTA	94 %
Cd ²⁺	107 %	Mn ²⁺	105 %	DTT	3 %
Ni ²⁺	102 %	Ca ²⁺	97 %	2-mercaptoethanol	1 %
Ba ²⁺	96 %	Mg ²⁺	92 %		
Zn ²⁺	108 %	Fe ²⁺	106 %		

*純化之野生株人類 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素與含 5 mM 各金屬離子及試劑之受質 pNPF，於 37⁰C 下作用，偵測 UV 波長 400 nm 的吸收值，以記錄反應初始速率，並換算與不含金屬離子之相對活性。

3-6、芳香類- α -L-岩藻糖糖苷化合物 (aryl- α -L-fucopyranosides)的合 成

合成芳香類- α -L-岩藻糖糖苷化合物作為酵素反應之受質，並有助於了解酵素在催化反應的機制、反應速率決定步驟的判定與催化重要殘基的鑑定等重要研究。但此類糖苷化合物的研究文獻有限且合成不易，由於芳香族在不同位置之取代基有著不同 pKa 的解離能力，因此，在耦合(coupling)反應上也必須依據 pKa 的不同而選擇，而 α -構型(1,2-cis)之岩藻糖糖苷化合物，於一般以 Acetobromoglycoside 為起始物^(94,95)與不同種類的 phenols 耦合之合成方法，所得到此芳香類- α -L-岩藻糖糖苷化合物的產物產率極少。因此，參閱相關文獻報導，以圖 2-1 與圖 2-2 的合成步驟策略，合成具有強離去基團之化合物 1-(trichloroacetimidate)-2,3,4-Tri-O-acetyl- α -fucopyranoside (如圖 2-1 中化合物 2)，於低溫-20 °C 下，藉以動力學控制(kinetic control)方式，與各芳香族化合物(phenols)進行耦合反應，提高 α -構型之岩藻糖糖苷化合物。建構合成本實驗所需的各類芳香族- α -L-岩藻糖糖苷化合物，所得各糖苷化合物約 65~75%的產物產率。這些芳香類- α -L-岩藻糖糖苷化合物的合成請參考本實驗室張世聖與陳朝勝同學論文⁽⁹²⁾。



各芳香類- α -L-岩藻糖糖苷化合物之結構與相關合成化合物之 ¹H-NMR (300MHz)光譜請參閱附錄 V、附錄 VI。

1. TAF : 8.22-8.19 (m, 2H, ArH), 7.17-7.13 (m, 2H, ArH), 5.86 (d, 1 H, J = 4.0Hz, H-1), 5.58 (dd, 1 H, J = 6.0,12.0Hz, H-3), 5.37 (ddd, 2 H, J = 6.0,6.0,12.0Hz, H-2, H-4), 4.29 (q, 1 H, J = 7.0, 14.0 Hz, H-5), 2.19 (s, 3 H, AcO), 2.05 (s, 3 H, AcO), 2.01 (s, 3 H, AcO), 1.21 (d, 3 H, J = 7.0Hz, H-6)。反應受質之分子式：C₁₄H₂₀O₉

2. 2,4-Dinitrophenyl- α -L-fucopyranoside (DNPF) : 1.32 (d, 3H, J = 6.0 Hz, H-6), 3.71-3.8 (m, 2H, H-4, H-5), 3.84 (dd, 1H, J = 3.6, 9.3 Hz, H-3), 4.14 (dd, 1H, J = 8.1, 9.5 Hz, H-2), 5.60 (d, 1H, J = 5.1 Hz, H-1), 7.50 (d, 1H, J = 9.0Hz, ArH), 8.45 (dd, 1H, J = 2.7, 9.3Hz, ArH), 8.69 (d, 1H, J = 2.7Hz, ArH)。反應受質之分子式：C₁₂H₁₄N₂O₉

3. 2-Fluoro-4-nitrophenyl- α -L-fucopyranoside (FNPF) : 1.09 (d, 3 H, J = 6.5 Hz, H-6), 3.81 (m, 2 H, H-4, H-5), 3.94 (dd, 1 H, J = 3.5, 9.6 Hz, H-3), 4.08 (dd, 1 H, J = 7.3, 9.6 Hz, H-2), 5.77 (d, 1 H, J = 3.16 Hz, H-1), 7.37 (d, 1 H, J = 9.2 Hz, ArH), 8.06 (dd, 1 H, J = 2.6, 9.2 Hz, ArH), 8.85 (d, 1 H, J = 2.6 Hz, ArH) 。反應受質之分子式 : $C_{12}H_{14}NO_7F$

4. 2-Chloro-4-nitrophenyl- α -L-fucopyranoside (CNPF) : 1.13 (d, 3 H, J = 6.6 Hz, H-6), 3.74-3.83 (m, 2 H, H-4, H-5), 3.95 (dd, 1 H, J = 3.6, 9.6 Hz, H-3), 4.33 (dd, 1 H, J = 7.6, 9.6 Hz, H-2), 5.71 (d, 1 H, J = 3.78 Hz, H-1), 7.31 (d, 1 H, J = 9.2 Hz, ArH), 8.08 (dd, 1 H, J = 2.6, 9.2 Hz, ArH), 8.85 (d, 1 H, J = 2.6 Hz, ArH) 。反應受質之分子式 : $C_{12}H_{14}NO_7Cl$

5. p-nitrophenyl- α -L-fucopyranoside (pNPF) : 1.22 (d, J = 6.0 Hz, 3H, H-6), 3.72-3.8 (m, 2H, H-4, H-5), 3.94 (dd, J = 3.0, 9.0 Hz, 1H, H-3), 4.30 (dd, 1 H, J = 7.2, 9.1 Hz, H-2), 5.87 (d, 1 H, J = 4.0 Hz, H-1), 7.33 (d, 2 H, J = 8.7 Hz, ArH), 8.32 (d, 2 H, J = 9.3 Hz, ArH) 。反應受質之分子式 : $C_{12}H_{15}NO_7$

6. 2-Methyl-4-nitrophenyl- α -L-fucopyranoside (MeNPF) : 1.20 (d, 3 H, J = 6.4 Hz, H-6), 2.37 (s, 3 H, CH₃), 3.72-3.78 (m, 2 H, H-4, H-5), 3.96 (dd, 1 H, J = 3.6, 9.6 Hz, H-3), 4.02 (dd, 1 H, J = 7.6, 9.6 Hz, H-2), 5.70 (d, 1 H, J = 4.88 Hz, H-1), 7.28 (d, 1H, J = 9.8 Hz, ArH), 8.08 (dd, 1 H, J = 2.6, 9.6 Hz, ArH), 8.11 (d, 1 H, J = 2.6 Hz, ArH) 。反應受質之分子式 : $C_{13}H_{17}NO_7$

7. m-nitrophenyl- α -L-fucopyranoside (mNPF) : 1.25 (d, 3H, J = 7.0Hz, H-6), 3.66-3.72 (m, 2H, H-4, H-5), 3.8 (dd, J = 3.5, 9.6 Hz, 1H, H-3), 4.16 (dd, 1H, J = 6.9, 9.3 Hz, H-2), 5.73 (d, J = 3.6Hz, 1H, H-1), 7.41-7.37 (m, 1H, ArH), 7.50-7.45 (m, 1H, ArH), 7.94-7.90 (m, 2H, ArH) 。反應受質之分子式 : $C_{12}H_{15}NO_7$

8. p-cyanophenyl- α -L-fucopyranoside (pCPF) : 1.21 (d, 3 H, J = 6.8 Hz, H-6), 3.7-3.76 (m, 2 H, H-4, H-5), 3.87 (dd, J = 3.0, 9.0 Hz, 1H, H-3), 4.16 (dd, 1 H, J = 7.2, 9.1 Hz, H-2), 5.83 (d, 1 H, J = 3.6 Hz, H-1), 7.12 (d, 2 H, J = 8.7 Hz, ArH), 7.65 (d, 2 H, J = 8.9 Hz, ArH) 。反應受質之分子式 : $C_{13}H_{15}NO_5$

9. phenyl- α -L-fucopyranoside (PF) : 1.25 (d, 3 H, J = 7.0 Hz, H-6), 3.74-3.82 (m, 2 H, H-4, H-5), 3.97 (dd, 1 H, J = 3.6, 9.0 Hz, H-3), 4.3 (dd, 1 H, J = 7.2, 9.5 Hz, H-2), 5.74 (d, 1 H, J = 3.6 Hz, H-1), 7.07-6.81 (m, 3 H, ArH), 7.33-7.21 (t, 2 H, ArH) 。反應受質之分子式 : $C_{12}H_{16}O_5$

3-6-1、酵素催化受質之特異性(substrate specificity)

根據以往醣苷酵素的研究，在外切型(exo-type)的醣苷水解酵素對催化水解的受質具有專一特異性。我們將純化出的人類 α -L-岩藻糖水解醣苷酵素測試水解下列各合成的芳香族 α -L-岩藻糖苷化合物受質之 K_m 及 k_{cat} 值：DNPF、CNPF、FNPF、pNPF、MeNPF、mNPF、pCPF、PF、pNPAP、pNPAF、pNP-Gal、pNP-Glc、pNP-GlcNAc，而將測得的 K_m 及 k_{cat} 值列於表 3-4、表 3-5。

表 3-4、野生株 *h*-Fuc 酵素對各種糖苷化合物催化反應^a之 K_m 及 k_{cat} 值。

Phenyl substrate	K_m (mM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($s^{-1}\cdot mM^{-1}$)
pNP- α -L-Fuc	0.284 ± 0.002	17.07 ± 0.02	60.11
p-NPAP ^c	0.73 ± 0.02	1.9 ± 0.1	2.6
p-NPAF ^c	ND ^b	ND	
pNP-Gal ^c	ND	ND	
pNP-Glc ^c	ND	ND	
pNP-GlcNAc ^c	ND	ND	

a. 酵素動力學反應條件：37 °C, 400 nm, 在 pH 6.8 的 50 mM 磷酸/0.1 M 氯化鈉緩衝溶液，所使用的各受質濃度為 0.25 ~ 2 mM。

b. ND：無法偵測催化活性。

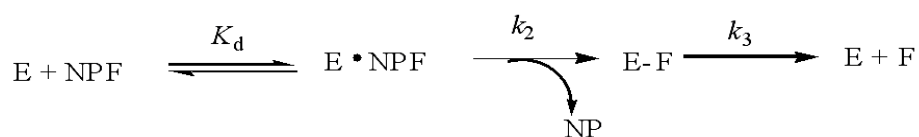
c. p-Nitrophenyl- β -D-arabinopyranoside (p-NPAP) 、 p-Nitrophenyl- α -L-arabinofuranoside (p-NPAF)、p-Nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (pNP-Gal)、p-Nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (pNP-Glc)、p-Nitrophenyl- β -N-acetylglucosamine (pNP-GlcNAc) (from sigma)。

由表 3-4 之結果得知，此野生株人類 α -L-岩藻糖水解醣苷酵素對反應受質糖基有著高特異性，其催化水解受質 pNPF 之動力學 $k_{cat} = 17.07 s^{-1}$ 、 $K_m = 0.284$ mM，而對於其它不同糖基結構之受質 pNPAF、pNP-Gal、pNP-Glc、pNP-GlcNAc 皆無催化活性。但卻發現受質 pNPAP 有著為受質 pNPF 約 1/23 倍的催化活性，其催化反應之動力學數值 $k_{cat} = 1.9 s^{-1}$ 、 $K_m = 0.73$ mM；乃因受質 pNPAP 與 pNPF 有著極相似結構，但卻於 arabinose 糖基中 C5 位置上由 -CH₃ 換成 -H，降低酵素對 pNPAP 之作用引力，而影響催化 k_{cat} 和 K_m 的改變。對岩藻糖糖基 C5 位置上的甲基，於過去研究中也已被證實對親和性具有極大的影響⁽⁹³⁾，若移去甲基亦使抑制能力大幅的降低千倍以上。而酵素對非糖基部位的特異性的選擇性，此點由表 3-5 之結果得知，酵素對

CNPF、FNPF、MeNPF、mNPF、pCPF、PF 等合成之岩藻糖糖苷化合物的水解反應速率，其 K_m 值相近，而 k_{cat} 卻可差到 2 至 4 個倍數。因此，藉由此酵素了解對受質糖基部位作用之高專一選擇性，及對 aryl- α -L-岩藻糖苷化合物受質之催化反應速率快慢性，進而助於我們對人類 α -L-岩藻糖水解除糖苷催化機構之瞭解，詳見章節 3-7 反應機構與速率部份。

3-7、酵素催化速率決定步驟之探討

α -L-岩藻糖水解除糖苷酵素於固定的酸鹼值及溫度條件下，對不同的受質有特定的 K_m 值。 K_m 為受質與酵素之複合體(enzyme-substrate complex; ES complex)的真正解離常數或顯現解離常數(apparent dissociation constant)。由 K_m 值之大小可判斷受質與酵素之親和力，而 k_{cat} 則為酵素之催化常數或 turnover number，它表示酵素催化反應中化學催化步驟的一級反應速率常數，亦即將 ES complex 經化學轉化而成酵素與產物之步驟。一般而言，若酵素催化步驟有多步時， k_{cat} 則被定義成反應中催化速率最慢那一步的速率常數，如以 α -L-岩藻糖水解除糖苷酵素而言，化學催化步驟為兩步驟的反應(k_2 、 k_3)，見下面流程：



k_2 ：離去基離去的速率，此步驟為一不可逆反應； k_3 ：水解速率

NPF：nitrophenyl fucoside，NP：nitrophenol，F：Fucose

此時的 k_{cat} (s^{-1})值常用來判斷反應速率決定步驟是哪一步驟(k_2 或 k_3)，這個觀點對研究多步驟酵素催化機制時，可清楚地描述某一個反應步驟的催化速率值或也可用來決定當使用不同受質時，速率決定步驟是位於多步驟中的那一步。而 k_{cat}/K_m ($s^{-1}mM^{-1}$)的定義是代表酵素催化一受質的催化效率，也可說是當酵素與受質結合後把受質催化的反應速率值，此效率值對 α -L-岩藻糖水解除糖苷酵素而言，也可代表上述流程中進行不可逆步驟反應的 k_2 值。

由早期人類肝臟⁽⁹⁷⁾以及細菌^(56, 65)之 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素相關研究得知其催化反應以保留構型機制進行，催化機制為似 S_N1 的兩步驟雙取代反應，為了探討哪一個步驟是速率決定步驟，我們分析不同解離度芳香族取代的 α -L-岩藻糖衍生物受質如：DNPF、3,4-DNPF、CNPF、FNPF、pNPF、MeNPF、mNPF、pCPF 及 PF 與純化之 *h*-Fuc 進行催化反應，所得到的動力學數據，以雙倒數作圖法將數據以線性迴歸方式分析之，可求得各不同受質的 K_m 、 k_{cat} ，將 K_m 、 k_{cat} 取對數值後與不同離去基之 pK_a 作圖，以建立 Brønsted plot。

利用不同受質分析動力學數據是用以了解水解酵素反應機構及重要胺基酸的主要方法之一，在構型保留的糖類水解酵素中，非糖基之斷裂是在第一步驟發生，因此，只有此一步驟會受離去基種類之影響。然而合成的各芳香族 α -L-岩藻糖苷化合物中， pK_a 較低的幾個受質如：2,4-dinitrophenyl- α -L-fucopyranoside ($pK_a=3.96$)、3,4-dinitrophenyl- α -L-fucopyranoside ($pK_a=5.36$) 配置於緩衝溶液中無法為 *h*-Fuc 酵素所水解及產生快速分解作用，無法適用於酵素動力學的相關實驗。對於其他芳香族 α -L-岩藻糖苷化合物受質 CNPF、FNPF、pNPF、MeNPF、mNPF、pCPF、PF， pK_a 值由 5.42 至 9.99，於 37 °C 相同的反應與分析條件下，50 mM 磷酸緩衝溶液(pH 6.8) 的活性測試系統中，由 *h*-Fuc 酵素對不同糖苷受質，分別為 CNPF、FNPF、pNPF、MeNPF、mNPF、pCPF 及 PF，以雙倒數作圖法，將數據以線性迴歸方式分析之測得其 K_m 值分別為 0.27 mM、0.28 mM、0.28 mM、0.48 mM、0.34 mM、0.71 mM 及 1.18 mM，由酵素對不同受質所得 K_m 與 k_{cat} 值及不同受質離去基之 pK_a 之數據列表於表 3-5。圖 3-10_A 是以 $\log k_{cat}$ 對受質離去基之 pK_a 作圖而得之 Brønsted plot；相同的，以 $\log k_{cat}/K_m$ 對受質離去基之 pK_a 作圖可得另一 Brønsted plot，如圖 3-10_B 所示。

表 3-5、野生株 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素對岩藻糖苷化合物之 K_m 與 k_{cat} 值。

substrate	pK_a	k_{cat} (s^{-1})	K_m (mM)	k_{cat}/K_m ($s^{-1}mM^{-1}$)	$\log k_{cat}$	$\log (k_{cat}/K_m)$
CNPF	5.42	18.77	0.27	68.77	1.27	1.84
FNPF	6.20	18.22	0.28	65.29	1.26	1.81
pNPF	7.18	17.07	0.28	60.11	1.23	1.78
MeNPF	7.42	13.64	0.48	28.42	1.13	1.45
mNPF	8.39	8.97	0.34	26.53	0.95	1.42
pCPF	8.49	8.95	0.71	12.58	0.95	1.1
PF	9.99	5.5	1.18	4.66	0.74	0.67

* 反應條件:50 mM 磷酸/100 mM 氯化鈉之緩衝溶液, pH6.8, 37 °C。

利用不同離去基受質分析動力學數據，是用以了解水解酵素反應機構及重要胺基酸的主要方法之一，在保留構型的糖苷水解酵素中，第一步驟 fucosylation 為酵素與受質作用結合後，以化學反應催化非糖基部分之斷裂發生。因此，於此一步驟催化作用受離去基之 pK_a 影響，而動力學 k_{cat} 和 k_{cat}/K_m 數據值變化，顯示著酵素對受質催化反應速率的決定步驟有關。由圖 3-10 所示，以 $\log k_{cat}$ 對不同芳香族離去基 pK_a 作圖，所得到之 Brønsted plot 為線性變化的單一關係(斜率 β_{lg} 值為 -0.13)。從另一方面來看，藉由代表酵素與受質結合之親和力，而轉換催化離去基離去(不可逆反應)效率之 $\log k_{cat}/K_m$ 對各不同芳香族離去基 pK_a 作圖，則呈緩慢線性下降(斜率 $\beta_{lg} = -0.27$)，顯示主因為 *h*-Fuc 酵素與糖苷受質反應結合之時(即形成 E·S complex)，非糖基部份之芳香族離去基的離去能力不高所致。各不同芳香族離去基之糖苷受質於反應作用時，其各 K_m 值隨著離去基之 pK_a 增加而變大，見表 3-5 所示。故推測酵素在催化反應中，其酵素與受質結合後，水解過程中催化胺基酸有大量電子轉移到糖基部分之一號碳(C1)原子上，糖基與離去基鍵結之 C-O 鍵只有少許之斷裂，即芳香族離去基之反應性影響對整個催化反應，推論反應速度決定步驟 (rate-limiting step) 為 fucosylation step。

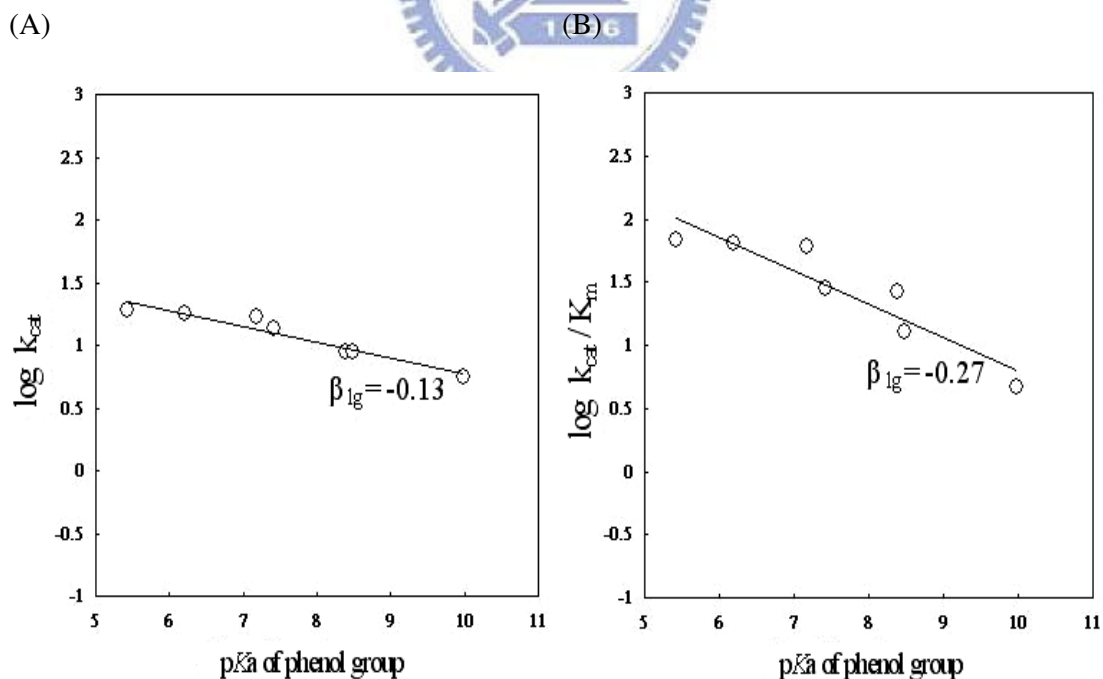


圖 3-10、野生株 *h*-Fuc 酵素之 Brønsted plot。

承接表 3-5 之作圖，(A)以 $\log k_{cat}$ 對 pK_a ，(B)以 $\log k_{cat}/K_m$ 對 pK_a 。

3-8、人類 α -L-岩藻糖水解酵素催化反應機制之研究

α -L-岩藻糖水解糖苷酵素(α -L-fucosidase, Fuc)至今被歸納分類成兩個家族，分別為家族GH-29和GH-95。這兩家族GH-29和GH-95，具有催化水解不同鍵結位向受質的專一性，其分別是 α -1-3,4和 α -1-2岩藻糖多醣受質。兩家族之 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素的催化機制構型(catalytic of the anomeric configuration)方式更是不相同，家族GH-95的催化方式為反轉機制(inversion mechanism)；另一家族GH-29以保留機制(retention mechanism)的方式水解糖苷鍵，在過去的研究上以原核細菌*T. maritime*和*S. solfataricus*兩細菌為主，但對於真核生物尚未。對於糖苷水解酵素的研究中，活性中心位置至少有兩個重要胺基酸(essential amino acid)參與反應，其反應機構由至少兩個重要步驟所組成，活性位置上之一未解離胺基酸側鏈(-AH) 或與受質離去基形成氫鍵或進行質子轉移至受質之離去基(leaving group)上，將受質活化以利另一解離之胺基酸側鏈進行親核性攻擊(nucleophilic attack)，即fucosylation step，而形成岩藻糖-酵素鍵結之過渡中間體，而後再水解此中間產物，即defucosylation step，放出岩藻糖完成反應。然而，該催化反應之中間/過渡狀態(Transition-State)則可能近似carbocation之結構或fucosyl-enzyme intermediate之結構，反應簡圖如圖3-11，活性位置中有至少二重要胺基酸側鏈，最可能是Aspartic acid或Glutamic acid。

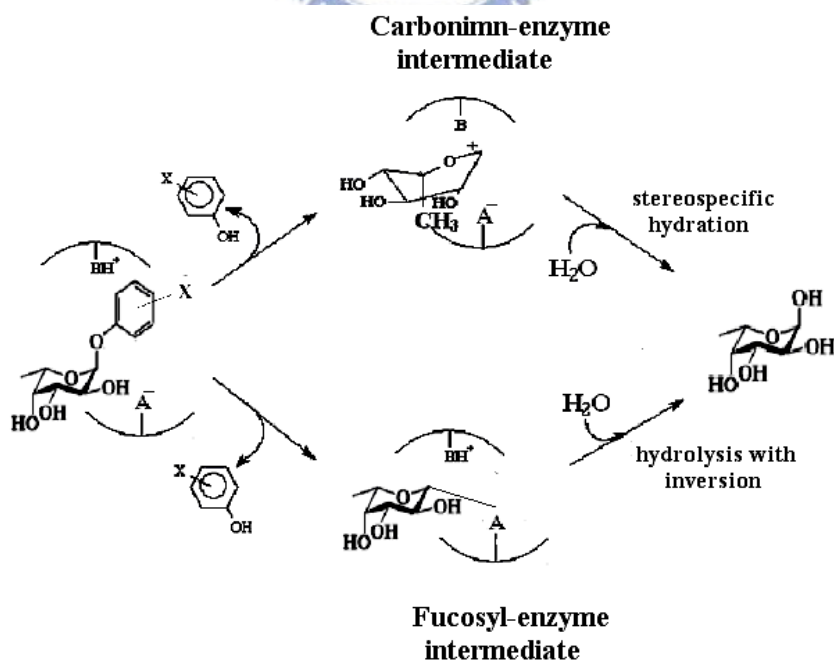


圖 3-11、人類 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素可能的反應機構簡圖。

3-8-1、以氫核磁共振儀研究人類 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素的立體選擇性

為了詳細研究此酵素的反應機構，我們以氫核磁共振磁譜於 25 °C 下，觀察 *h*-Fuc 酵素催化水解 pNPF 之反應情形。結果整理於圖 3-12 及圖 3-13。受質 pNPF 在反應前，糖基上碳 1 位置的 H 原子為雙分裂(doublet)吸收峰，其化學位移(chemical shift)為 $\delta=5.87$ ppm， $J_{1,2} = 4.0$ Hz，如圖 3-12 所示。反應之後， α -form 糖基上碳 1 位置之質子的化學位移為 $\delta = 4.48$ ppm， $J_{1,2} = 3.9$ Hz，而 β -form 糖基上碳 1 位置之質子的化學位移則為 $\delta = 5.12$ ppm， $J_{1,2} = 8.1$ Hz。由圖 3-13，長時間追蹤之氫譜圖可看出，反應未開始前在化學位移為 $\delta = 4.48$ ppm 及 5.12 ppm 處，證實尚無產物產生。反應開始 15 分鐘後，化學位移 $\delta = 4.48$ ppm 處產生一新分裂吸收峰；而反應開始 30 分鐘後，除化學位移於 $\delta = 4.48$ ppm 之吸收峰外，化學位移 $\delta = 5.12$ ppm 處開始出現另一新的分裂吸收峰，此時 $\alpha : \beta = 95 : 5$ 。隨水解反應繼續至 60 分鐘時，其 $\alpha : \beta$ 分別為 88 : 12。由此可看出，產物中先以生成 α -form 岩藻糖基。之後， α -form 的糖基在溶液中進行 mutarotation 而形成 β -form 糖基。當反應進行 150 分鐘後，溶液內之岩藻糖已呈現平衡狀態，產物中 α -form 對 β -form 的糖基比值為 72:28。由反應所得到的產物為 α -form 的糖，可見 *h*-Fuc 酵素反應為兩步驟取代反應的催化機制(double displacement mechanism)，反應機構說明參考圖 3-11。第一步驟為酵素與受質結合後，受質的離去基進行酸催化反應，形成岩藻糖-酵素鍵結之過渡態中間體 (fucosyl-enzyme intermediate) 並放出 phenol；第二步驟為極化水分子進入與岩藻糖-酵素鍵結之中間體，進行水解反應然後放出糖基，如此可得一保留構形的產物。

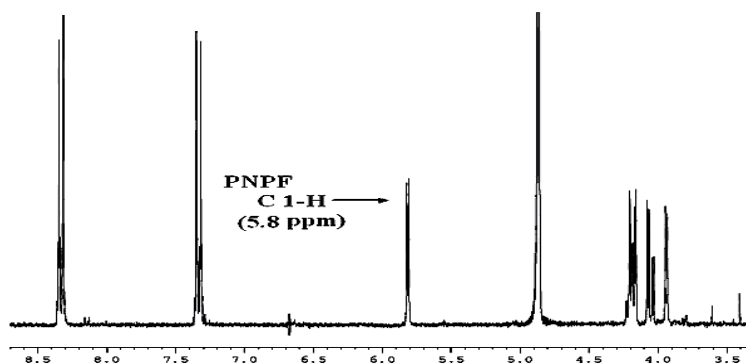


圖 3-12、受質 pNPF 之糖基 C 1 上氫原子之化學位移。

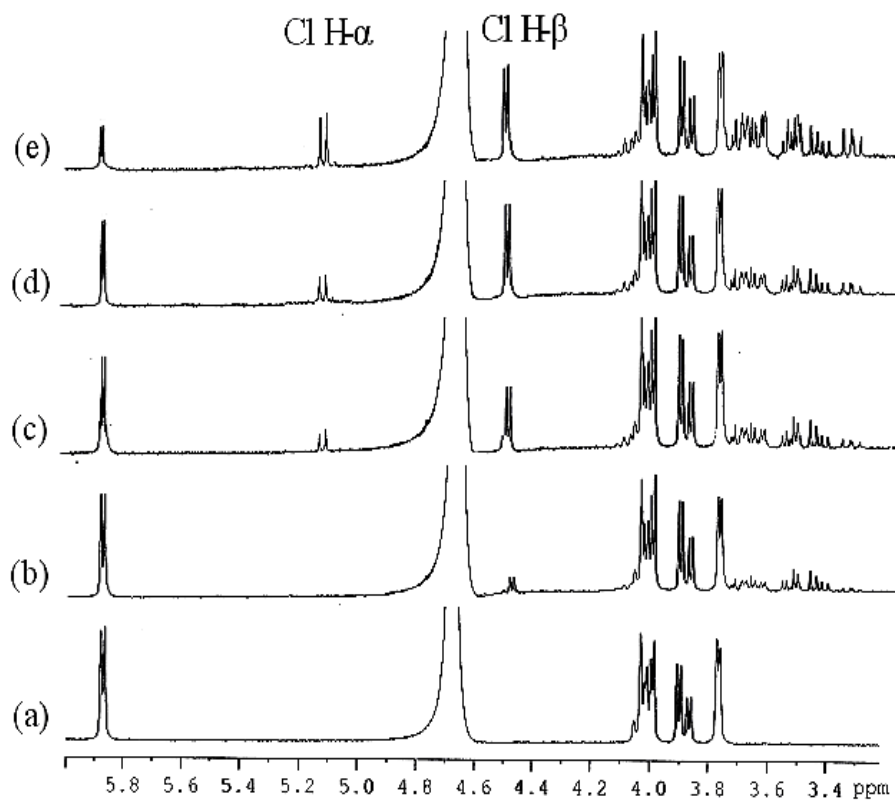
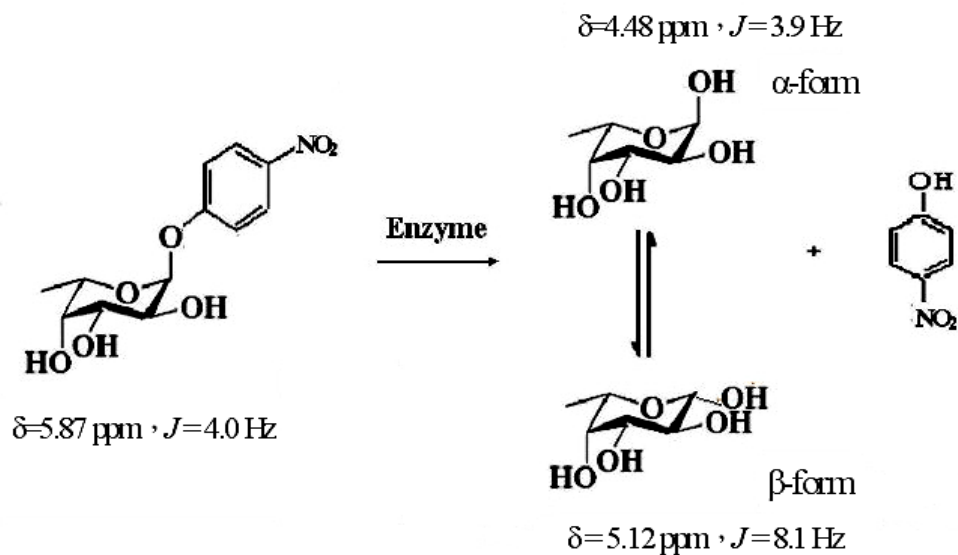


圖 3-13、以氫核磁共振儀追縱 *h*-Fuc 酵素催化水解受質 pNPF 之反應立體選擇性。

- (a) 受質 pNPF 未加入 *h*-Fuc 酵素之光譜圖。
- (b) 加入 *h*-Fuc 酵素與受質 pNPF，反應 15 分鐘後之光譜圖。
- (c) 加入 *h*-Fuc 酵素與受質 pNPF，反應 30 分鐘後之光譜圖。
- (d) 加入 *h*-Fuc 酵素與受質 pNPF，反應 60 分鐘後之光譜圖。
- (e) 加入 *h*-Fuc 酵素與受質 pNPF，反應 150 分鐘後之光譜圖。

3-8-2、共同反應中間體(Common intermediate)

對於雙取代的保留機制之糖苷水解酵素，第一步驟為酵素與受質結合後，受質的離去基進行酸催化反應，形成岩藻糖-酵素鍵結之過渡態中間體，並放出 phenol。第二步驟為極化水分子進入與岩藻糖-酵素鍵結之中間體進行水解反應，然後放出糖基，如此可得一保留構形的產物。但若在第二步驟中，以其他醇類或糖化合物取代時，可得相同鍵結位向型式的轉糖產物。因此，可進一步了解其酵素催化反應的過程中，糖-酵素中間體的形成與否，判斷產物結構，得到更有利之反應機制證據，見圖 3-14。

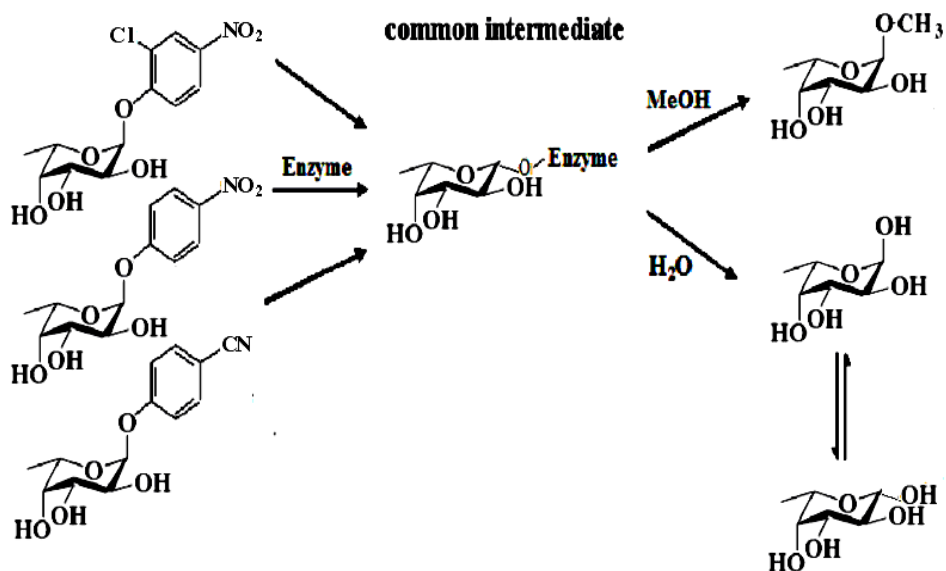


圖 3-14、經由共同反應中間體之推測 *h*-Fuc 酵素之催化反應途徑。

我們由酵素反應之 pH-profile 活性的鐘型曲線，可知酵素在催化過程中可能有兩個重要胺基酸參與反應，為分析 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素之保留(retentig)催化反應機制為兩步驟 (two-step) 型態，則需要有證據證明此催化反應經由一個反應中間體。因此，我們利用此酵素轉糖的能力，以三種不同芳香族之離去基受質 (CNPF、pNPF、pCPF)，在一控制濃度之甲醇(6.0 M)來觀測其作用產物之種類與比例變化。當三反應受質分別加入 *h*-fuc 酵素，待各起始物完全被水解作用時，溶液由無色澄清變成完全黃色後，立即終止。隨後將產物分別乾燥、收集並以 D₂O 多次置換多餘的水分子。反應之殘餘收集物以液相 LC/MS 偵測分析為 :1-MeFuc(m/z = 201.12)和

L-Fuc(m/z = 187.11), 見圖 3-15_A; 另一經由 $^1\text{H-NMR}$ 圖譜測量, 其結果見圖 3-15_B。調整 NMR chamber 的溫度至 50 °C 使訊號移動(參閱本實驗室陳韋宏論文⁽⁹⁶⁾), 此一溫度下可以使 $\alpha\text{-MeFuc}$ 上 C1-H 之化學位移(chemical shift)移動到 4.39 ppm ($J_{1,2} = 3.4$), 而不會與溶劑(D_2O)的訊號有重疊。在 50 °C NMR 的光譜中, 我們定 $\alpha\text{-MeFuc}$ 上 C1-H 之分裂吸收峰訊號積分值為 1, 其餘之重要訊號為: $\alpha\text{-Fucopyranoside}$ 之 C1-H 化學位移 4.18 ppm ($J_{1,2} = 3.9$)以及 $\beta\text{-Fucopyranoside}$ 之 C1-H 化學位移 5.13 ppm ($J_{1,2} = 8.2$), 其積分值如表 3-6。並求得此三不同反應受質之 Fuc/MeFuc 比例值。

表 3-6、轉醣反應之重要糖基 NMR 積分訊號

	$\alpha\text{-MeFuc}$ C 1-H	$\beta\text{-Fuc}$ C 1-H	$\alpha\text{-Fuc}$ C 1-H	Ratio*
CNPF	1	0.25	1.06	1.31
pNPF	1	0.22	1.11	1.33
pCPF	1	0.26	1.04	1.30

* Ratio 是將 $\alpha\text{-Fucopyranoside}$ C1-H 及 $\beta\text{-Fucopyranoside}$ C1-H 之積分訊號相加後除以 $\alpha\text{-MeFuc}$ C1-H 之積分訊號

由表 3-6 數據可知其酵素催化反應之產物比例幾近相同, 並由 $^1\text{H-NMR}$ 圖譜得知, 此 *h-fuc* 酵素有轉醣的反應, 並為保留構型之催化特性(retention of the anomeric configuration); 實驗中控制甲醇與水的比例, 最後得到相同比例的反應產物, 說明了在酵素催化的過程中, 在不同的受質的條件下都會經過一個共同反應中間體(common intermediate), 間接的證明此酵素之催化反應為兩步驟的反應機制。

因此, 該岩藻糖水水解醣苷酵素以圖 1-12 所示之機構進行催化, 此機構為一雙取代構型保留之反應(double displacement & retention of anomeric configuration), 涉及兩步驟 (two-step)反應。首先, 為酵素醣基化(Glycosylation)形成一糖基-酵素鍵結之中間體, 第二步驟則由水或其他親核劑, 如醇類, 對此過渡態的中間體進行親核性攻擊反應, 以除去酵素上之醣基, 此步驟稱為去醣基化(deglycosilation)。在催化的過程中會涉及至少兩個重要之胺基酸殘基, 其功用各為扮演親核性基團(低 pKa 者), 另一則為扮演一般酸/鹼催化基團(高 pKa 者)。

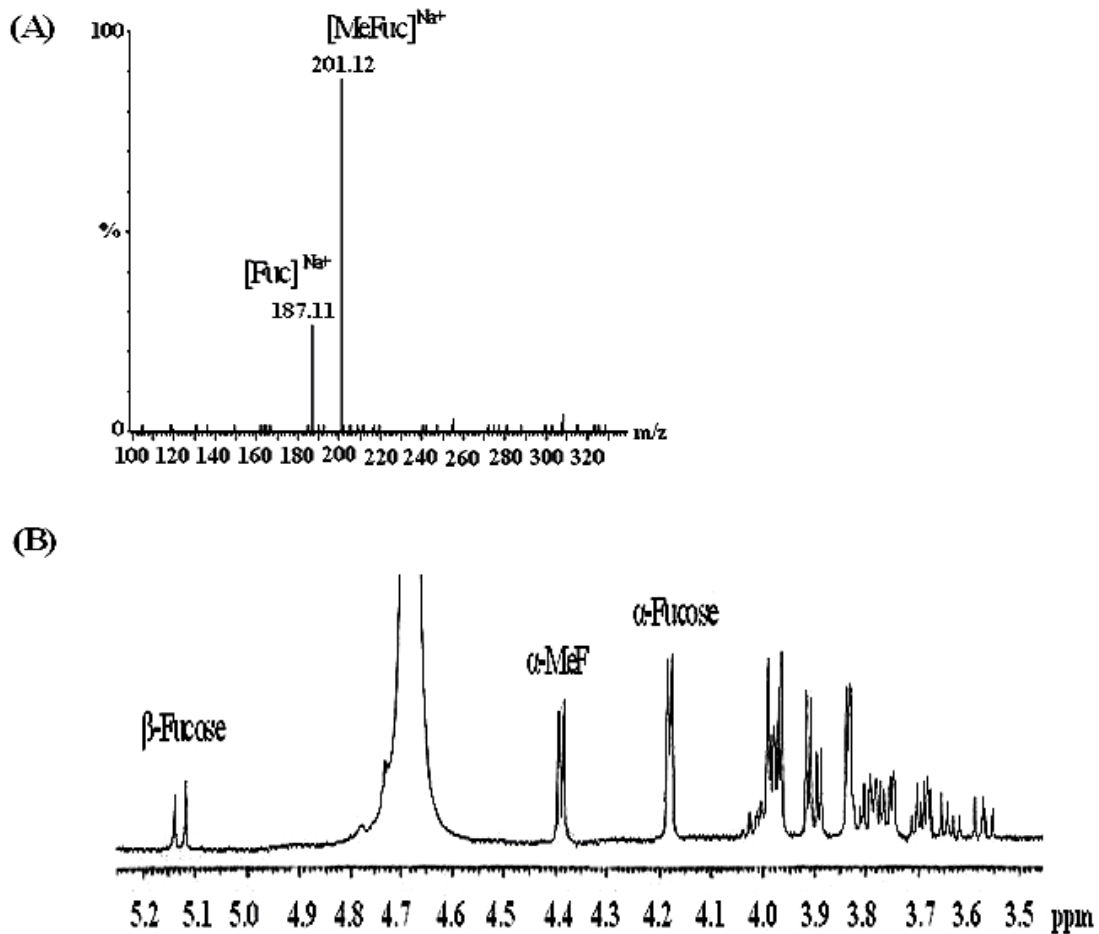


圖 3-15、野生株 *h*-Fuc 酵素與 pNPF/ MeOH 所進行之轉糖反應。

(A) 產物 LC/MS 分析圖譜，(B) 50 °C 之產物 ¹H-NMR 光譜圖。

3-9、酸鹼度對重組人類 α-L-岩藻糖水解酵素活性之影響

酵素存在於不同酸鹼度中會有其活性上的差異，因此將酵素與受質置於不同酸鹼值的緩衝液中進行反應，並測量其初始反應速率。所使用的緩衝溶液及其酸鹼值為： $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{Citric acid}$ (50 mM/100 mM NaCl, pH 3.5)、NaOAc (50 mM/100 mM NaCl, pH 4.0、4.5、5.0、5.5)、MES (50 mM/100 mM NaCl, pH 6.0)、 Na_2HPO_4 (50 mM/100 mM, pH 6.5、7.0、7.5)；所使用的反應受質為 p-nitrophenyl- α -L-fucopyranoside (0.01 mM~2 mM)，總體積 400 μl ，反應於 37 °C 在 3 分鐘內完成。於動力學實驗過程中，反應受質 pNPF 的濃度配置要有所注意，是否有產物回饋抑制作用。此現象發生於 *T.*

maritime α -L-岩藻糖水解醣苷酵素之動力學研究上，當反應受質 pNPF 的濃度超過 2 mM 時，反應的初始速率會受到水解後的產物 L-岩藻糖所抑制影響而下降⁽⁵⁶⁾，但此現象對於人類 α -L-岩藻糖水解醣苷酵素上並無發現此現象作用，見圖 3-16_A。一般而言， K_m 值的求法可用以下兩種方法求得：以 Michaelis-Menten equation 作圖法得 $K_m=0.387$ mM， $k_{cat}= 29.68$ s⁻¹，及雙倒數作圖法(double reciprocal plot)作圖法得 $K_m=0.39$ mM， $k_{cat}= 29.71$ s⁻¹，兩者實驗的計算結果並無太大的差距。因此，本研究所使用 K_m 及 k_{cat} 值之計算方式，主要是採用雙倒數作圖法，見圖 3-16_B。

將不同酸鹼值下所得到的初始反應速率以 Lineweaver-Burk method 作雙倒數圖(double reciprocal plot)，計算 K_m 以及 k_{cat} 相關反應數值，再將這些數值對酸鹼值作圖，即可得知不同酸鹼值對酵素活性的影響。對於醣苷水解酵素(Glycoside hydrolase)而言，若是 pH-profile 呈現鐘型曲線的趨勢，表示酵素活性由兩個 pKa (apparent pKa) 之重要催化殘基調控催化反應，受外在 pH 的高低而顯現出胺基酸基團的游離，其 pK_{a1} 的解離值與催化反應之扮演親核性基團胺基酸有關； pK_{a2} 的解離值為扮演一般酸/鹼催化角色之胺基酸基團，在許多酵素的研究中，此兩個 pKa 反應出兩個胺基酸殘基在催化過程中扮演重要角色。圖 3-17 可以明顯的看出其趨勢為鐘型曲線，在低 pH 值(EH₂ form 之存在比例較多)和高 pH 值(E²⁻ form 之存在比例較高)其活性均明顯下降，在 pH 4.3~6.0 其酵素具有較強之活性且兩個 pKa 各為 3.8 及 6.1，由此推論具有催化活性的酵素為單一解離態(mono deprotonated form)。



對於醣苷水解酵素(Glycoside hydrolase)而言，若 pH-profile 呈現對稱鐘型曲線(bell-shaped curve)的趨勢，表示酵素活性由兩個 pKa (apparent pKa) 操控，在許多酵素的研究中，此兩個 pKa 反應出兩個胺基酸殘基在催化過程中扮演重要角色。 α -L-岩藻糖水解醣苷酵素主要也是遵循此一特性進行反應，如 2002 年 Tarling C. A. … 等人⁽⁵⁶⁾對來自於 *T. maritime* 之 α -L-岩藻糖水解醣苷酵素重組蛋白的研究中，酸鹼值對酵素活性的影響為一鐘型曲線分布；但相較之下人類 α -L-岩藻糖水解醣苷酵素之重組蛋白其酸鹼值與酵素活性的關係非一單純的鐘型曲線分布(見圖 3-18)，而是具有兩個相對較佳的反應 pH 值，分別為 pH 4.5 以及 pH 6.5。pH 5.0 時，重組之 *h*-Fuc 酵素對 pNPF

的 $K_m = 0.105 \text{ mM}$ ， $k_{cat} = 48.6 \text{ sec}^{-1}$ ；相同條件下，由人體肝臟純化得到的原生 *h*-Fuc 之 $K_m = 0.43 \text{ mM}$ ($0.26 \pm 0.03 \text{ mM}$ ⁽²⁴⁾)， $V_{max} = 19.6 \text{ } \mu\text{mole/mg/min}$ (k_{cat} 約為 16.3 sec^{-1})⁽⁹⁷⁾。重組酵素的催化能力(k_{cat}/K_m)約為肝臟原生酵素的 12 倍。

關於這個特殊的現象，Alhadeff... 等人⁽⁹⁷⁾ 早期於人體肝臟萃取純化所得原生 *h*-Fuc 的相關研究中曾經有提出過；而我們以純化之重組 *h*-Fuc 酵素所得到酸鹼值與酵素活性的關係圖(如圖 3-17 所示)和其相比對彼此之間有著相類似結果(如圖 3-19 所示)。但重組蛋白質的活性最佳區域稍微往 pH 值較高的區域偏移⁽²⁴⁾，但 pH 高於 7.5 後酵素的穩定度降低；而 pH 低於 3.5 以後，酵素也會變的極不穩定，這與肝臟原生 α -L-岩藻糖水解醣苷酵素的性質略有不同。推測可能是透過大腸桿菌表現系統所表現的重組 *h*-Fuc 酵素不具有醣類以及唾液酸的修飾，使酵素的性質產生了些許的變化所造成，這與 Alhadeff... 等人曾經使用 *N*-glycanase 將萃取的人類肝臟 α -L-岩藻糖水解醣苷酵素之醣類移除後所得到的數據類似⁽²⁴⁾。根據實驗中所取得的動力學數據與 Alhadeff 等人的研究結果^(17, 19, 97) 比較，我們可以得知醣類修飾對 *h*-Fuc 酵素結構的影響不大，酵素的催化能力並沒有巨大的改變。因此，推測 *h*-Fuc 酵素上的醣類修飾，主要功能很可能是為了維持蛋白質能夠在生物體中於酸性環境下穩定的運作。

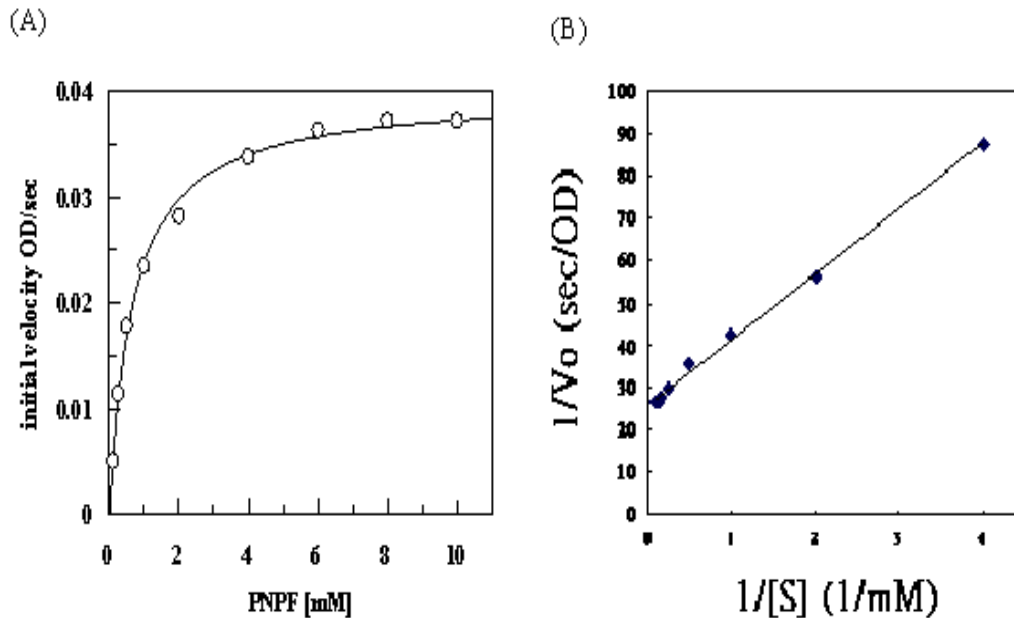


圖 3-16、以(A) Michaelis-Menten equation 作圖法和(B) 雙倒數作圖法，求解酵素對 pNPF 之 K_m 及 k_{cat} 。([E] = $0.93 \text{ } \mu\text{g/mL}$, pH 6.0, $37 \text{ } ^\circ\text{C}$, 348nm)

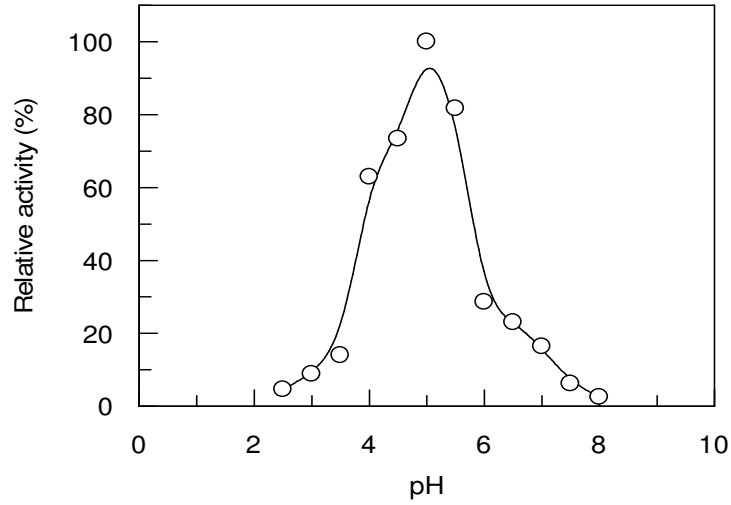


圖 3-17、酸鹼度對重組之野生株 *h-Fuc* 酵素催化活性之影響。

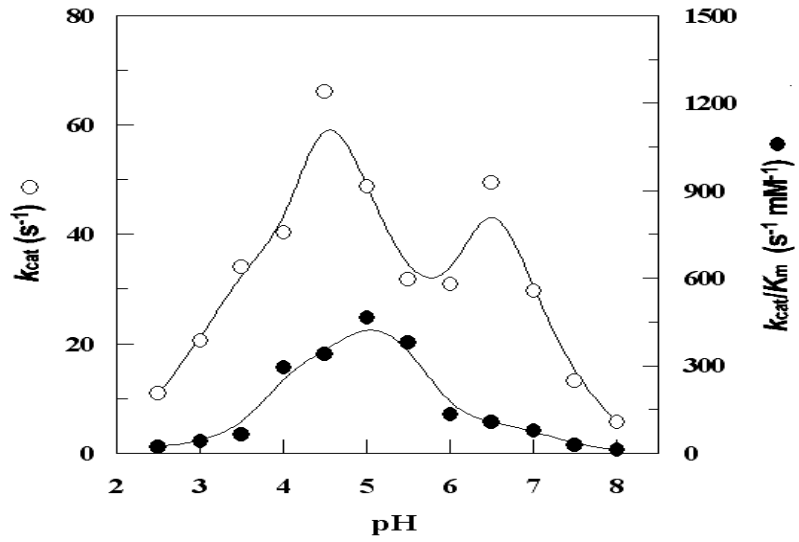


圖 3-18、重組之野生株 *h-Fuc* 酵素之不同酸鹼度的 k_{cat} 與 k_{cat}/K_m 。

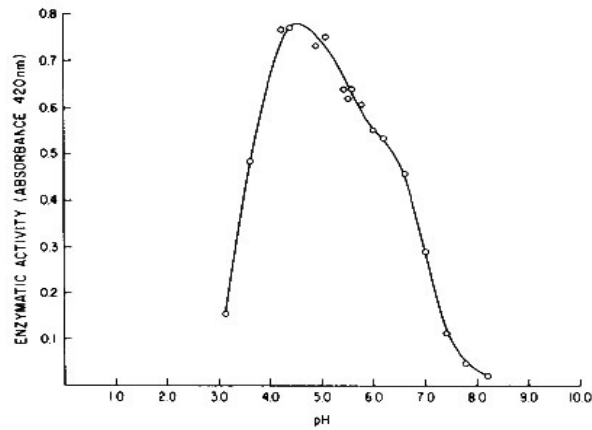


圖 3-19、原生肝臟人類 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素活性與 pH 值的關係圖 (摘錄至文獻 97)。

3-10、人類 α -L-岩藻糖水解醣苷酵素之蛋白結構模擬與催化重要殘基序列二級結構比對分析

在醣類水解酵素家族研究中，可檢視出其酵素催化作用之殘基為 Aspartic acid (Asp/D)或Glutamic acid (Glu/E)兩酸性胺基酸。過去在家族GH-29水解醣苷酵素動力學上催化機制及扮演催化殘基之胺基酸，已由原核細菌 *T. maritima* α -L-岩藻糖水解醣苷酵素的3D蛋白結構與定點突變之酵素動力學研究，得知其扮演親核性及一般酸/鹼催化胺基酸分別為 Asp²²⁴及Glu²⁶⁶位置^(56,63)，與另一原核細菌 *S. solfataricus*之 α -L-岩藻糖水解醣苷酵素研究，所扮演親核性及一般酸/鹼催化胺基酸的位置則分別為Asp¹⁵⁰及Glu⁵⁸(及為扮演一般酸/鹼催化輔助角色之胺基酸Glu²⁹²)^(65,66)。同時，該家族的第一個蛋白質晶體結構亦於2005年，由Steven Withers學者從原核細菌 *T. maritima*中，以X-ray繞射解析出⁽⁶³⁾，PDB資料庫為1HL8，1HL9，1ODU。相較於該家族之真核與哺乳生物的此方面研究則有限，其中在人類肝腫瘤標示蛋白的 α -L-岩藻糖水解醣苷酵素重要性，於醫藥相關研究已有不少文獻報導，但有關此酵素的蛋白質表現、催化重要殘基鑑定和動力學數據仍顯不足。由基因庫(Genbank)檢視得知，家族GH-29之醣苷水解酵素中，已有三十多種以上來自原核、真核與動植物的 α -L-岩藻糖水解醣苷酵素序列。針對這家族的真核與哺乳生物蛋白質利用生物資訊網站(SDSC WORKBENCH)進行演化樹分析比對，結果如圖3-20所示。從家族GH-29真核與哺乳生物的演化樹狀圖中，可觀察演化分成兩個族群，一為哺乳生物與另一原、真核菌。而在哺乳動物的 α -L-岩藻糖水解醣苷酵素上，可發現人類、狗與大鼠的胺基酸序列有高達80%以上的相似性；但與其他各來源生物彼此之間胺基酸序列比對的相似度上，卻僅有22~27%相似性。若將 *T. Maritima*、*S. solfataricus*、和人類等三個 α -L-岩藻糖水解醣苷酵素之胺基酸進行一級多重序列比對(見附錄VII)，人類與*S. solfataricus*、*T. maritima*彼此間的相似度分別只為20%與38%。有鑒於生物的蛻變過程中，往往伴隨著基因或蛋白質體的演化，造成在各蛋白質胺基酸序列上有所改變，但對相同受質催化機制的酵素而言，在催化殘基特性上絕大多數往往仍是有高度保留。因此，我們仍以Tm-Fuc和Ss-Fuc兩酵素之相關研究作為本論文的研究參考基準，並與清大張承文博士共同合作，試圖以各項生物資訊軟體與網站，提供*h*-Fuc酵素可能蛋白質結構模擬與GH-29子家族中各相關的多重序列與二級結構比對分析，並結合基因定點突變，觀測何者突變點在酵素催化活性上有明顯改變，來解開*h*-Fuc酵素之催化重要殘基。

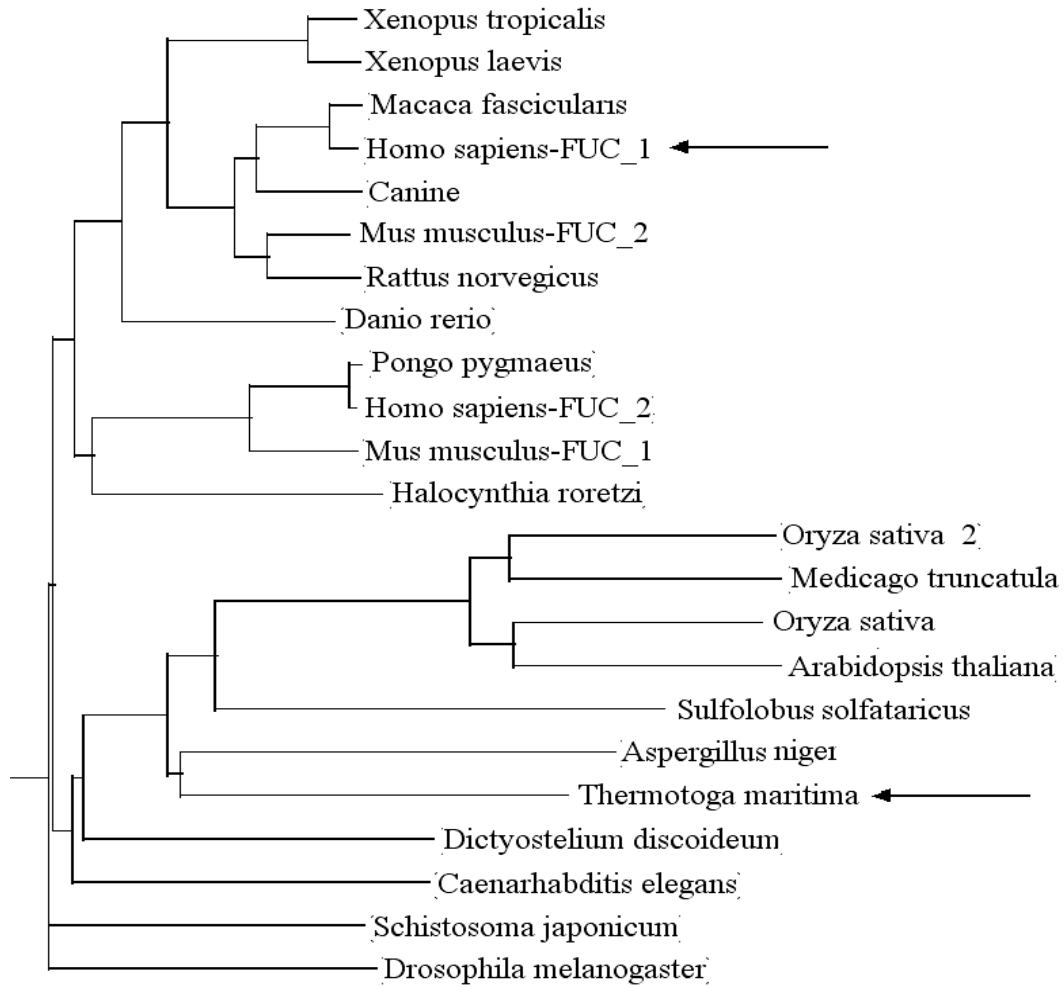


圖3-20、家族GH-29 *T. maritima*與真核生物之 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素之演化樹狀圖。

以Biology WorkBench 3.2 CLUSTALW (San Diego Supercomputer Center, CA, USA) 生物資訊網站軟體，比對糖苷水解酵素家族GH-29之原、真核菌種與哺乳動物 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素之胺基酸序列的相異性：BAD_46679 (*Xenopus tropicalis*)，AAH_70977 (*Xenopus laevis*)，BAD_51957 (*Macaca fascicularis*)，AAA_52482 (*Homo sapiens-FUC_1*)，CAA_63362 (*Canine*)，BAB_22277 (*Mus musculus-FUC_2*)，CAA_34268 (*Rattus norvegicus*)，AAH_50158 (*Danio rerio*)，CAH_89472 (*Pongo pygmaeus*)，CAB_53746 (*Homo sapiens-FUC_2*)，BAB_21949 (*Mus musculus-FUC_1*)，BAB_85519 (*Halocynthia roretzi*)，AAH_90371 (*Oryza sativa_2*)，ABO_83113 (*Medicago truncatula*)，CAD_41070 (*Oryza sativa_1*)，NP_180377 (*Arabidopsis thaliana*)，CAC_24067 (*Sulfolobus solfataricus*)，CAK_41610 (*Aspergillus niger*)，AAD_35394 (*Thermotoga maritima*)，AAO_51149 (*Dictyostelium discoideum*)，CAA91546 (*Caenorhabditis elegans*)，AAP_05896 (*Schistosoma japonicum*)，AAM_50292 (*Drosophila melanogaster*)。

首先，以糖苷水解酵素家族29中，*T. maritima* (Tm-Fuc，Q9WYE2，PDB：1ODU)為結構模擬的基礎模板來源。Tm-Fuc之3D蛋白結構中，蛋白質N-端序列從7至359所形成一 $(\alpha/\beta)_8$ 之桶狀類似區域，而活化中心為8個 β -平板結構(β -sheet)所構成，並含有6個 α -螺旋結構(α -helix)圍繞於此中心。由Tm-Fuc結晶數據得知催化中心之受質-酵素複合體鍵結之二級結構中，位於至蛋白序列C-端終止的第4與第6個 β -平板結構上，分別為扮演親核性基團與一般酸/鹼催化基團所在位置，兩羧酸基團上氧基平均距離約為 $\sim 4.7\text{\AA}$ ，此研究對家族GH-29之人類 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素之動力學催化機制與重要殘基研究將有莫大的幫助。我們將*h*-Fuc與Tm-fuc兩酵素，利用生物資訊相關軟體網站進行胺基酸比對，並利用 Swiss-Model server (<http://swissmodel.expasy.org/>) 的Insight II package program，建立人類 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素之3D-CPH model蛋白結構分子模擬(見圖1-13所示)。發現此兩酵素在一級序列與結構模擬的比對分析的相似度上，只有著34 % identity和38 % homology。雖然無法以100 %的正確性模擬出*h*-Fuc蛋白結構，但在Steven Withers的研究文獻中曾提及，兩酵素的受質糖-酵素docking結構模擬比對圖中，可發現位於酵素活化中心開口處，Tm-Fuc多了一段嵌入區域(insertion loop)，使得*h*-Fuc活化中心的開口較Tm-Fuc明顯有著較小的立體障礙，見圖3-21所示。

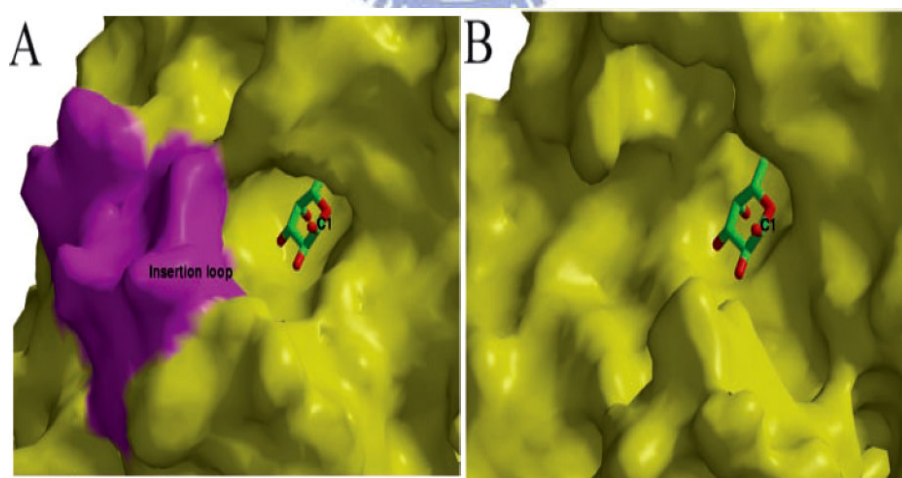


圖 3-21、受質糖與岩藻糖水解酵素蛋白質鍵結之 3D 結構圖。

(A) 位於 Tm-Fuc 與岩藻糖複合體結構之催化中心周圍的 3D 立體結構圖；(B) 同(A)之 *h*-Fuc 與岩藻糖複合體的 3D 立體模擬結構圖。(此圖摘錄至文獻 63。)

從我們所作 *h*-Fuc 酵素之蛋白結構模擬大致可觀察到，random-loop 二極結構較 Tm-Fuc 為多，且催化中心周圍所構成之結構障礙也較小且疏散。而這些在蛋白結構的差異現象，也意謂著過去幾年對 α -L-岩藻糖水解醣苷酵素的抑制劑篩選研究上，對酵素催化反應作用有著直接影響關係。Glyconojirimycin(即糖基分子之六圓環上氧原子，以氮原子取代)是一類對醣苷水解酵素有強烈作用的抑制劑，而 fuconojirimycin 對 α -L-岩藻糖水解醣苷酵素則是有絕佳親和抑制性，在相關的衍生物更被持續的合成且探討；其中以中研院林俊宏老師等學者利用以 fuconojirimycin 為核心以組合化學的方式合成各種不同的 fuconojirimycin 衍生物以探討活性區的結構特性^(98,99)。在這一類的抑制劑衍生物，發現對岩藻糖糖基 C1 部分取代的衍生物中，有些對 α -L-岩藻糖水解醣苷酵素具有即強烈的親和抑制性，其 K_i 值可以達到 picomolar ($\sim 10^{-12}$) 的水準。同時，該研究團隊更發現使用同一種的抑制劑對不同生物來源的 α -L-岩藻糖水解醣苷酵素進行抑制作用的研究，其抑制能力在這些不同生物來源的酵素彼此間會有高達一萬倍的差別。這些結果亦顯示，因不同演化來源的 α -L-岩藻糖水解醣苷酵素扮隨著蛋白質結構上的差異，使酵素對醣類受質中 aglycon 部分的鍵結位置(binding site)具有明顯的差異⁽¹⁰⁰⁾；相繼影響酵素(E)與受質(S)形成複合體(ES)的速率 k_1 或對受質的催化反應、鍵結作用引力上…等有所不同之差異，而這方面關於結構的研究已經小有成果，但仍需要更多相關酵素的晶體結構更有助於釐清以及比較活性區的差異。

從 Tm-Fuc 蛋白晶體結構與 *h*-Fuc 的蛋白模擬結構，可概略得知家族 GH-29 之酵素催化中心為一 $(\alpha/\beta)_8$ 結構區域構造(又名 TIM-barrel 區域)。藉由配合 CAZY (<http://www.cazy.org/>) 與 InterPro (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>) 兩資料庫，搜尋家族 GH-29 中與 *h*-Fuc 蛋白序列高相似度，且為 TIM-barrel 區域催化中心結構的其他不同來源生物之 α -L-岩藻糖水解醣苷酵素 序列進行比對，包括有：*Halocynthia roretzi* (Q8TA71, Hr-Fuc)、*Schistosoma japonicum* (Q86FH9, Sj-Fuc)、*Pongo abelii* (Q5RFI5, Pa-Fuc)、*Drosophila melanogaster* (Q9VTJ4, Dm-Fuc)、*Caenorhabditis elegans* (P49713, Ce-Fuc)、*Dictyostelium discoideum* (P10901, Dd-Fuc) 等真核、哺乳生物，彼此與 *h*-Fuc 序列相似度高達 70 % 以上。隨後將 Tm-Fuc、*h*-Fuc 和其他選擇的蛋白質各區段序列全送到 PSIPRE 二級結構的分析預報網站 (<http://zeus.cs.vu.nl/programs/pralinewww/>)，分析預測各蛋白質序列之二級結構，見圖 3-22 所示。並利用 Combinatorial Extension (CE) 方法，以兩 C_α - C_α 彼此距離小於 20 Å 為原則，預測選擇的蛋白質彼此間可能之

二級結構，協助找尋 *h*-Fuc 序列中可能扮演重要催化殘基所在位置。從詳細的二級結構胺基酸序列比對分析結果中可發現，原核與真核、哺乳生物 α -L-岩藻糖水解醣苷酵素的二級結構中，各酵素胺基酸序列保留區相似程度仍有迥然不同之差異。對已鑑定出 Tm-Fuc 酵素中扮演親核性重要殘基之胺基酸 Asp²²⁴ 而言，是位於蛋白催化中心 TIM-barrel 晶體結構所在之二級結構 β 4-平板結構上，此一區域更發現在家族 GH-29 的其他生物來源之酵素胺基酸序列上，有著一致性的完全高度保留為 -WxDx-。這暗示著 *h*-Fuc 酵素，位於相同的 β 4-平板結構上所相對應之胺基酸 Asp²²⁵ 位置，極高度可能為扮演親核性重要殘基團所在。從定點突變酵素之動力學實驗結果亦發現，*h*-Fuc 突變株 D225G 酵素之 k_{cat} 催化速率值與野生株相比，降低約 5,800 倍；相關證據說明 Asp²²⁵ 為 *h*-Fuc 酵素中扮演親核性胺基酸之位置，將於下面章節實驗詳細描述討論。

過去對同分屬家族GH-29中，已從Tm-Fuc、Ss-Fuc兩酵素相關3D蛋白晶體結構與定點突變株酵素動力學研究，得知在酵素中扮演一般酸/鹼催化胺基酸之位置分別為Glu²⁶⁶和Glu⁵⁸。藉由生物資訊軟體網站從家族GH-29所有生物來源酵素群中，找尋了六個子家族(sub-families)胺基酸序列上與*h*-Fuc酵素有著>80 %的高保留度，並與Tm-Fuc酵素共八個子家族序列作二級結構模擬之序列比對，結果見圖3-22所示，以試圖進一步尋找扮演一般酸/鹼胺基酸的位置。從Tm-Fuc酵素所扮演一般酸/鹼基團之胺基酸Glu²⁶⁶所在位置觀之，乃為一極短肽所構成的 β 6-平板結構，此二級結構相對應於*h*-Fuc和其它來源菌種酵素的模擬比對結果卻為random-strand或 α -螺旋結構；且此二級結構的區域所呈現之序列比對保留度亦極低。但*h*-Fuc酵素位在此序列區域中，有著兩胺基酸位置可能扮演一般酸/鹼催化基團，分別為胺基酸Glu²⁷⁵和Asp²⁷⁶(其中在各哺乳生物中，此區域之序列(xxDxx)為胺基酸Asp²⁷⁶位置，比對上更有著完全高度保留度)。我們利用定點突變方式使這兩胺基酸失去原有含羧酸基團(-COO⁻)，卻發現酵素之活性仍有98 %催化反應速率 k_{cat} 值。因此，進一步透過所模擬的*h*-Fuc酵素蛋白結構，於八個 β -平板結構所構成TIM-barrel區域的催化中心上，尋找這八個二級結構區域序列上有胺基酸Asp和Glu之位置，利用定點突變方式，篩選催化反應速率上明顯改變之突變點。發現於所模擬*h*-Fuc酵素之蛋白二級結構的胺基酸序列中，對應於Tm-Fuc晶體結構的 β 5-和 β 7-平板結構上，分別有兩個胺基酸Asp²⁵⁸和Glu²⁸⁹，有著極可能扮演一般酸/鹼胺基酸的位置所在。而實驗初步結果顯示，胺基酸Glu²⁸⁹之突變株酵素在催化速率上與野生株相比，下降450倍以上。結果將於**章節3-16至3-21**等詳細探討。

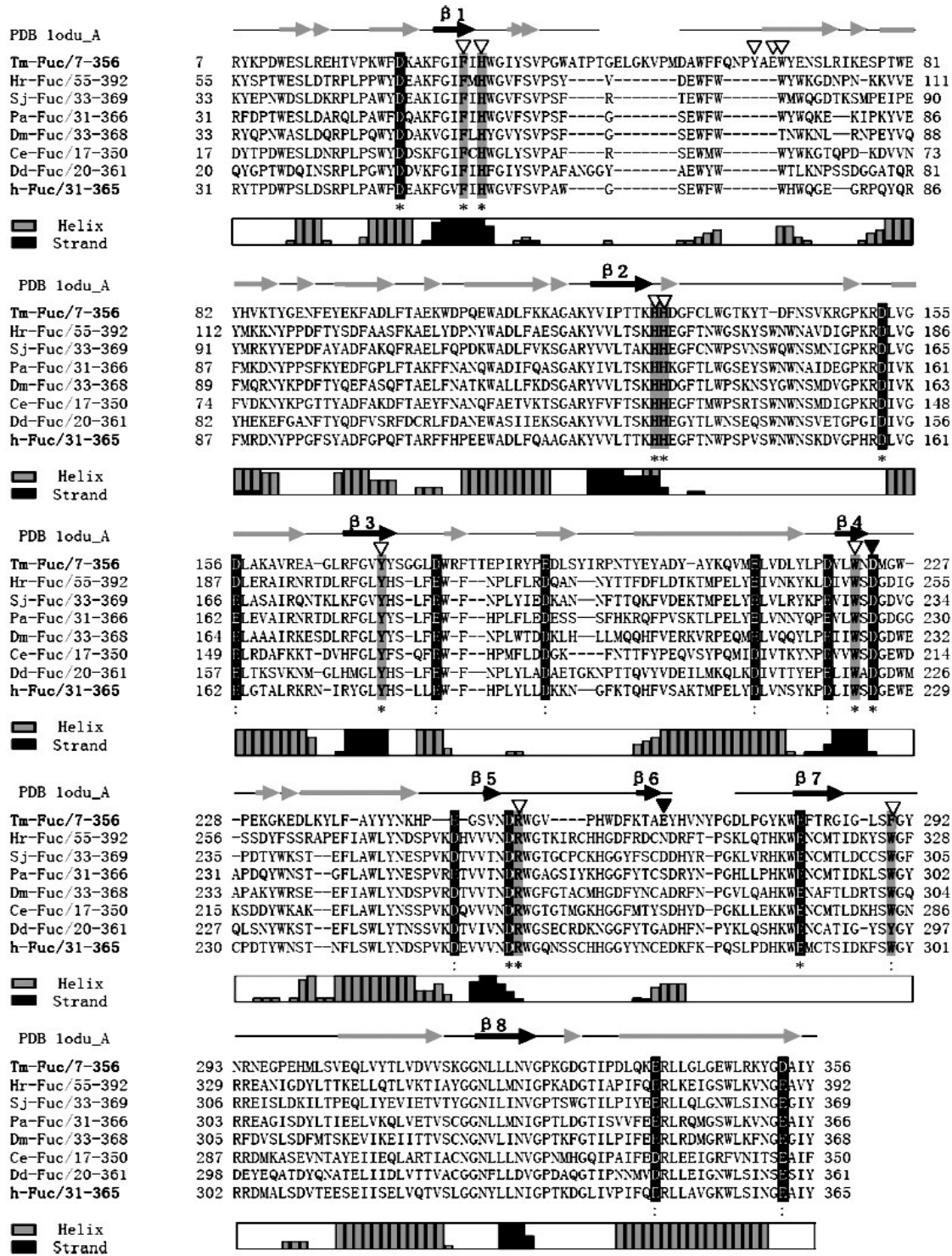


圖 3-22、利用各來源之岩藻糖水分解糖苷酵素部份胺基酸序列，以 MuSiC-ME 軟體進行蛋白質二級結構比對。(圖中灰色區塊代表蛋白質二級結構 α -helix 區域，黑色區塊代表蛋白質二級結構 β -sheet 區域，各代碼所代表之岩藻糖水分解糖苷酵素分別為：
h-Fuc: *Homo sapiens* (P04066)；Tm-Fuc: *T. maritime* (Q9WYE2, PDB 號碼:1ODU)；
Hr-Fuc: *Halocynthia roretzi* (Q8TA71)；Sj-Fuc: *Schistosoma japonicum* (Q86FH9)；
Pa-Fuc: *Pongo abelii* (Q5RF15)；Dm-Fuc: *Drosophila melanogaster* (Q9VTJ4)；Ce-Fuc: *Caenorhabditis elegans* (P49713)；Dd-Fuc: *Dictyostelium discoideum* (P10901)。

另外，在過去對 α -L-岩藻糖水解醣苷酵素的催化反應機制研究報導中，發現來自原核細菌*S. solfataricus*的 α -L-岩藻糖水解醣苷酵素在催化水解作用中，有著兩位置胺基酸扮演一般酸/鹼基團的角色^(66,101)，分別為胺基酸Glu⁵⁸與Glu²⁹²(兩胺基酸位置彼此分別對應於 Tm-Fuc酵素中胺基酸Glu⁶⁶與Glu²⁶⁶，和*h*-Fuc酵素的胺基酸Glu⁷⁹與Glu²⁷⁵)，其中以胺基酸Glu²⁹²與Tm-Fuc、*h*-Fuc兩酵素中扮演一般酸/鹼基團位置區域之蛋白質多重序列有著中度保留性；而對胺基酸Glu⁵⁸而言，卻呈現出極低保留度。就Tm-Fuc酵素中兩胺基酸Glu⁶⁶與Glu²⁶⁶而言，當以定點突變使其失去含有羧酸基團時，兩突變株酵素對受質pNPF的催化反應速率 k_{cat}/K_m 值分別降低約460與65,000倍，且在蛋白晶體結構此兩胺基酸所在位置上之側鏈基團與受質岩藻糖C1上兩氧基彼此之平均作用距離，分別為~6.8 Å與~3.7 Å(胺基酸Glu⁶⁶之作用距離為Glu²⁶⁶的兩倍之遠)。因此，胺基酸Glu²⁶⁶在Tm-Fuc酵素中為扮演一般酸/鹼催化的主要殘基，而胺基酸Glu⁶⁶則是扮演著酵素催化中心與受質糖彼此氫鍵引力作用的重要角色。但在Ss-Fuc酵素的研究結果卻發現，兩位置之胺基酸於酵素催化作用上扮演的角色卻與Tm-Fuc酵素有所差異。在文獻中提及對Ss-Fuc酵素的兩胺基酸Glu⁵⁸與Glu²⁹²進行突變後，使其失去催化的羧酸基團後，在不同pH值溶液中進行酵素水解活性作用，以求得兩位置胺基酸之突變株酵素所呈現的反應活性pH-profile曲線圖。結果發現以胺基酸Glu⁵⁸所進行定點突變之酵素株，在不同pH值溶液中所表現出pH-profile的催化特徵與反應活性性值，與在Tm-Fuc酵素中扮演一般酸/鹼催化功能作用的胺基酸Glu²⁶⁶是相同；相反的，對胺基酸Glu²⁹²的突變株酵素所觀測的活性反應性值卻與胺基酸Glu⁶⁶相近。該兩位置之胺基酸在以不同離子組成的各不同pH值緩衝溶液中，對胺基酸解離作用程度之影響，更反應於酵素之催化活性作用的不同。同時，兩位置胺基酸之突變株酵素更利用疊氮親核性陰離子進行催化活性復活反應，其結果亦說明對細菌*S. solfataricus*的 α -L-岩藻糖水解醣苷酵素中扮演主要一般酸/鹼催化之胺基酸為Glu⁵⁸，而胺基酸Glu²⁹²則為催化中心與受質糖彼此間氫鍵吸引力作用力很重要角色，或可能為酵素中扮演另一一般酸/鹼催化的輔角色。

結合利用資訊軟體進行家族GH-29胺基酸序列的多重比對及蛋白質結構分子模擬後的各項訊息，我們提出一質疑是否此家族的酵素成員，雖有相同的催化機制與相同保留區位置的親核基之胺基酸，但對於扮演一般酸/鹼催化基團胺基酸並非在同一保留區位置上？在Ss-Fuc酵素中扮演一般酸/鹼催化之胺基酸Glu⁵⁸，其位置相對

於*h*-Fuc酵素的序列為胺基酸Glu⁷⁹。而關於胺基酸Glu⁷⁹對*h*-Fuc在催化反應上的影響如何？這些詳細的內容也將於本論文後續中進行討論。

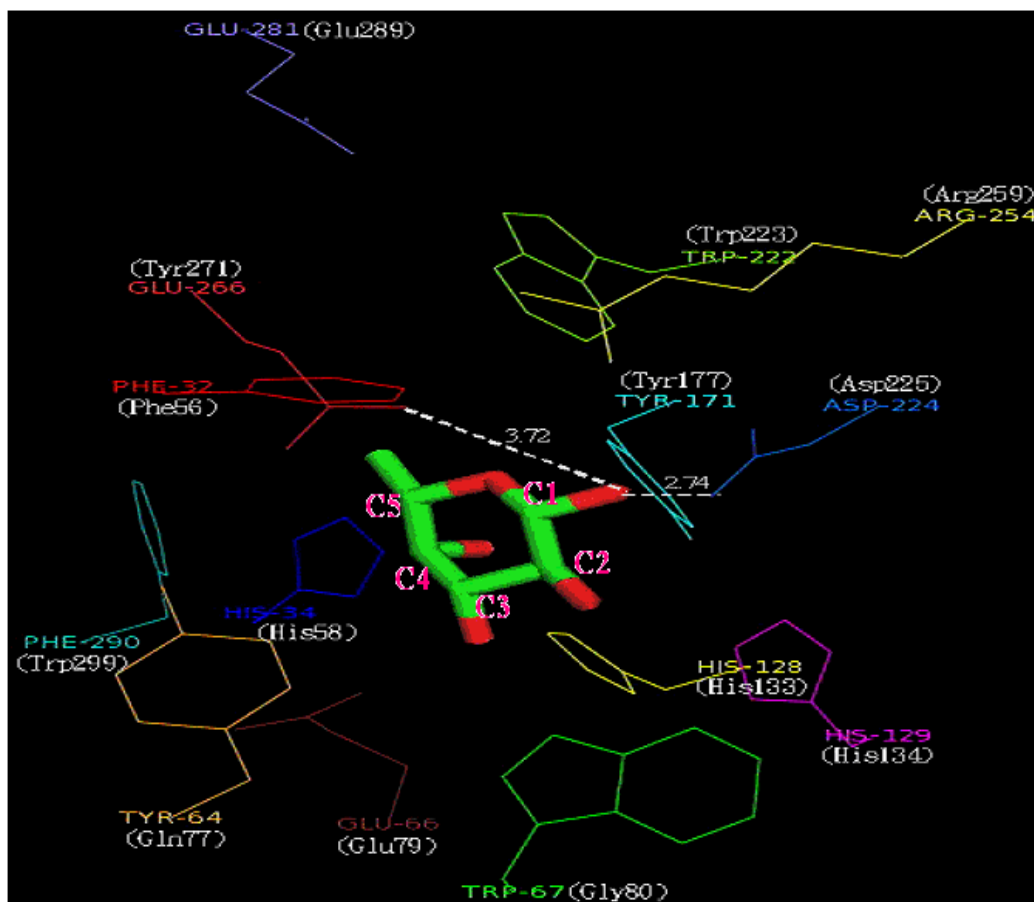


圖 3-23、*T. maritime* α -L-岩藻糖水水解酵素之複合晶體結構，於活性中心與岩藻糖有鍵結作用力之各胺基酸位置。(刮號中為 *h*-Fuc 酵素比對後，相對應於 *T. maritime* 岩藻糖水水解酵素活性中心位置的各胺基酸位置)

那到底人類岩藻糖水水解糖苷酵素的一般酸/鹼胺基酸的位置為何？仍需更多的研究數據，才能綜合加以分析判斷。我們在 Tm-Fuc 複合體晶體結構中，可觀測到扮演親和性基團 Asp²²⁴ 及一般酸/鹼催化 Glu²⁶⁶ 的兩胺基酸，與受質岩藻糖 C1 上-OH 基團的作用距離分別為 2.74Å 和 3.72Å；而其他位於催化中心距離 5 Å 之內，與受質岩藻糖各位置上-OH 基團有著強氫鍵相互作用力的胺基酸包括：His³⁴/C4-O:2.48 Å、

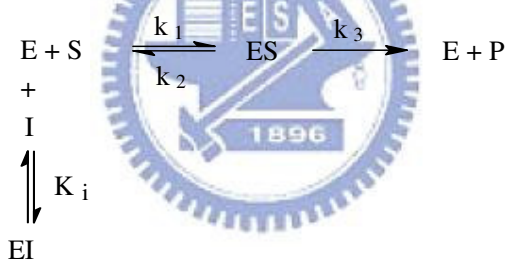
Glu⁶⁶/C3-O : 2.26 Å 、 His¹²⁸/C3-O : 2.82 Å 、 His¹²⁸/C4-O : 2.83 Å 、 His¹²⁹/C2-O : 2.85 Å 、 Asp²²⁴/C1-O : 2.74 Å 、 Arg²⁵⁴/C1-O : 3.52 Å 和 Glu²⁶⁶/C1-O : 3.72 Å , 見圖 3-23 所示。若將這與受質岩藻糖相互作用力的距離增加至 10 Å 之內時, 發現的胺基酸包括有: Phe³² (Phe⁵⁶)、His³⁴ (His⁵⁸)、Tyr⁶⁴ (Gln⁷⁷)、Glu⁶⁶ (Glu⁷⁹)、Trp⁶⁷ (Gly⁸⁰)、His¹²⁸ (His¹³³)、His¹²⁹ (His¹³⁴)、Tyr¹⁷¹ (Tyr¹⁷⁷)、Trp²²² (Trp²²³)、Asp²²⁴ (Asp²²⁵)、Arg²⁵⁴ (Arg²⁵⁹)、Glu²⁶⁶ (Tyr²⁷¹) 和 Phe²⁹⁰ (Trp²⁹⁹) (括號內為相對應 *h*-Fuc 序列之胺基酸)。因此, 將這些觀察並配合透過個八子家族的醣苷酵素所做之詳細二級結構胺基酸序列比對分析結果, 我們選擇幾個胺基酸 Aspartic acid 和 Glutamic acid 作定點突變, 包括 Glu⁷⁰ (E70)、Glu⁷⁹ (E79)、Glu¹³⁵ (E135)、Asp¹⁵⁸ (D158)、Asp²²⁵ (D225)、Asp²⁵⁸ (D258)、Glu²⁷⁵ (E275)、Asp²⁷⁶ (D276) 及 Glu²⁸⁹ (E289) 等九個突變點, 雖然 Glu⁷⁰、Glu⁷⁹、Glu¹³⁵、Asp¹⁵⁸、Asp²²⁵、Asp²⁵⁸、Glu²⁷⁵、Asp²⁷⁶ 及 Glu²⁸⁹ 等九個胺基酸有些並無座落於 *T. maritima* α -L-岩藻糖水解醣苷酵素相對應的催化活性中心位置上, 我們仍將這些胺基酸當作 *h*-Fuc 酵素可能扮演親核性基團及一般酸鹼催化胺基酸的候選員, 將上述胺基酸進行定點突變後再利用與各合成之糖苷受質的動力學水解數據、活性改變及其他研究方式, 探討這些胺基酸中何者為扮演親核性基團或一般酸/鹼催化胺基酸。此將於下面內容章節, 分別來探討對 *h*-Fuc 酵素親核性基團及一般酸/鹼催化胺基酸的分析鑑定結果。

3-11、抑制劑之研究

抑制作用之研究可有效地用以模擬酵素之活性催化中心與受質之間的結合作用，更是探討酵素催化機構的重要方法。抑制劑可分為兩大類：一為不可逆抑制劑 (irreversible inhibitors)，另為可逆抑制劑 (reversible inhibitors)。

3-11-1 競爭性抑制作用

對可逆抑制劑而言，是一可進出酵素活性催化中心，有一作用的解離常數；藉此索酵素活性區之特性，並幫助瞭解催化反應機構。可逆性抑制劑 (reversible inhibition) 有數種形式如競爭性、非競爭性、無競爭性、混合式等，此處以競爭性抑制劑 (competitive inhibitor)⁽¹⁰²⁾ 進行研究，故以下僅就競爭性類型提出說明。競爭性抑制劑是抑制劑與受質互相競爭佔有酵素內的活性中心，可以下式表示⁽¹⁰³⁾：



其反應速率可寫成下式：

$$V = \frac{V_{\max}[S]}{K_m \left[1 + \frac{[I]}{K_i} \right] + [S]}$$

[I]：抑制劑濃度

K_i ：抑制常數 (酵素－抑制劑複合體的解離常數)

由上式可知，若 V_{\max} 不變， K_m 變大，即為競爭性抑制劑。

將兩邊取雙倒數，即可將上式變為

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_m \left[1 + \frac{[I]}{K_i} \right]}{V_{\max}[S]}$$

以 $1/V$ 對 $1/[S]$ 作圖

$$\text{斜率為 } \frac{K_m \left[1 + \frac{[I]}{K_i} \right]}{V_{\max}}, \text{ 截距為 } \frac{1}{V_{\max}}$$

所以在雙倒數作圖法中，不同競爭性抑制劑濃度下的雙倒數圖形皆有相同的截距，即圖形在 $1/V$ 軸相交於同一點。

競爭性抑制劑的 K_i 值求法主要是利用沒有加入抑制劑的速率 $V_{(-)}$ 與有加抑制劑的速率 $V_{(+)}$ 之比值 γ 來求的。其求法如下：

$$\gamma = \frac{V_{(-)}}{V_{(+)}} = \frac{\frac{V_{\max}[S]}{K_m + [S]}}{\frac{V_{\max}[S]}{K_m\alpha + [S]}} = \frac{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) + [S]}{K_m + [S]}$$

將上式移項合併得

$$\text{將 [I] 對 } \frac{(K_m + [S])\gamma - [S]}{K_m} - 1 \text{ 作圖，所得斜率即為 } K_i。$$

在競爭型的抑制作用中，此處將針對三個抑制劑：L-Fucose、1-O-Methyl- α -L-Fucose 及 δ -Fuconolactone，於下面分別探討研究之。L-Fucose 為 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素催化反應之產物，對 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素有著競爭、迴饋抑制作用；1-O-Methyl- α -L-Fucose 為 L-Fucose 之類似物，在於糖基分子 C1 上以非極性之甲氧(-OCH₃)基團取代極性的氫氧(-OH)基團，與酵素催化中心的作用引力有不同影響，對 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素亦有競爭抑制作用；而其中 δ -glyconolactone 對糖苷水解酵素有著強烈親和力，被歸因於結構與反應機構中之可能中間過渡狀態體類似物 (transition-state analogue)，亦即與 oxocarbenium ion 類似。因此，我們將對 Fucose、1-O-Methyl- α -L-Fucose 及 δ -Fuconolactone 進行抑制常數 K_i 的研究。另一以疊氮鈉 (NaN₃) 與野生株酵素進行抑制反應 K_i 的研究，而此將作為日後 azide rescue 的對照實驗組。

將 α -Fucose、1-O-Methyl- α -L-Fucose 及 δ -Fuconolactone 三個抑制劑，分別於含有糖苷受質 pNPF 的 50 mM 磷酸緩衝溶液 (pH 6.8) 條件下，各配置一系列不同濃

度後，與野生株 *h*-Fuc 酵素反應。以不同 δ -Fuconolactone 的抑制濃度，相對應於與 *h*-Fuc 酵素反應後之 $(K_m + [S])\gamma - [S]/K_m - 1$ 值作線性關係圖，所測得斜率即為 K_i ，如圖 3-24 所示。(另從 α -Fucose、1-*O*-Methyl- α -L-Fucose 兩藥物以 V 與 S 雙倒數作圖以求得抑制常數 K_i ，並從作圖看出皆為標準競爭型抑制作用，見附錄 VIII 所示)，將所測得各抑制劑之抑制常數整理於表 3-7。從表中顯示，除了疊氮鈉(NaN_3)非為 *h*-Fuc 一良好的抑制劑外，三個競爭型抑制劑： α -Fucose、1-*O*-Methyl- α -L-Fucose、 δ -Fuconolactone 與野生株酵素反應後，所得的 K_i 分別為 0.368 mM、0.528 mM 和 0.77 mM。

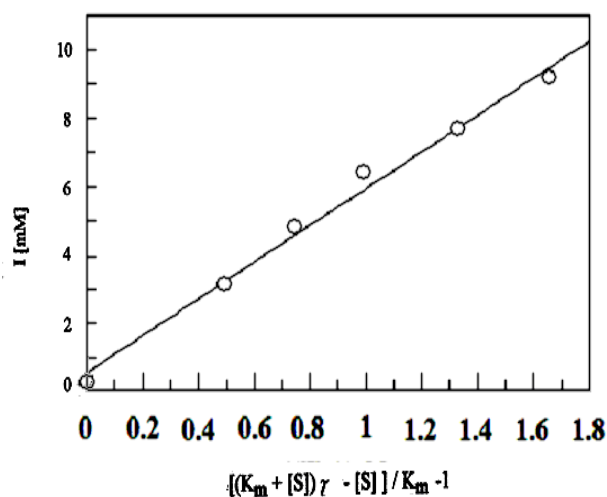


圖 3-24、Fuconolactone 的抑制常數 K_i 值。

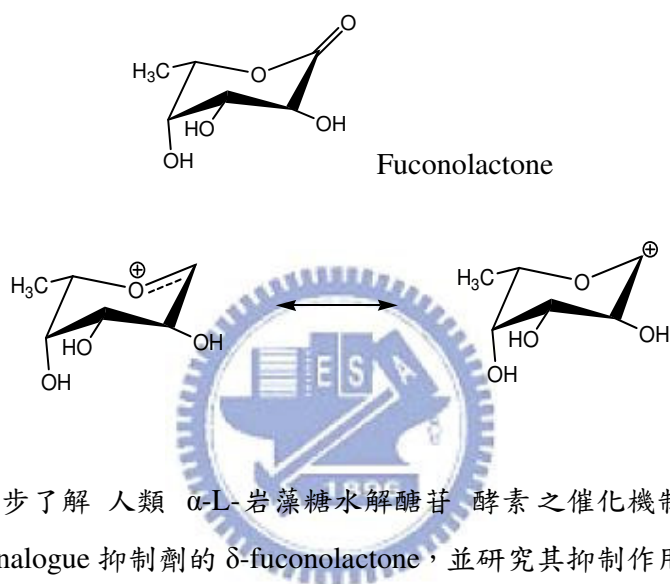
表 3-7、野生株 *h*-Fuc 與各可逆、不可逆抑制劑的抑制常數 (K_i)

Inhibitor	Inhibition constant (K_i) ^a	
	Wild type	
NaN_3	2.17 M	
L-Fucose	0.368 mM	
1- <i>O</i> -Methyl- α -L-fucopyranoside	0.528 mM	
Fuconolactone	0.77 mM	
EPFP	0.032 mM (K_i)	
	0.66 s ⁻¹ (k_i) ^b	

a. 酵素動力學反應條件：以 pNPF 為反應受質，在 37 °C，UV 吸收波長 400 nm，50 mM 磷酸緩衝溶液 (pH 6.8) 含不同濃度之各可逆、不可逆抑制劑。

b. 依 $(k_{\text{obs}} = k_i [I] / (K_i + [I]) [I])$ EPFP 濃度)，雙倒數作圖，由線性迴歸，得到抑制速率常數 (k_i) 及抑制常數 (K_i)

於**章節 3-8**所提及描述，在一般醣類水解酵素的催化水解作用或過程中，可能會經由一 oxocarbenium ion 過渡態而完成反應。對 *h*-Fuc 酵素所反應的糖苷受質構型而言，岩藻糖 (fucose) 可謂屬於 ground-state 抑制劑；而所相對應之醣類內酯 (glyconolactone)，其結構與反應機構中之過渡活化中間體(亦即 oxocarbenium ion)類似(如下圖： δ -fuconolactone 於酵素催化水解反應可能的過渡態結構)，亦與醣苷水解酵素有強親和力，均為相當好的抑制劑，其抑制常數在 micromolar~nanomolar($10^{-6} \sim 10^{-9}$) 之間。



為進一步了解人類 α -L-岩藻糖水解醣苷 酵素之催化機制，我們合成了 transition-state analogue 抑制劑的 δ -fuconolactone，並研究其抑制作用。由實驗明顯得知 δ -fuconolactone 和 *h*-Fuc 酵素反應作用測得抑制常數 K_i 值，與其他文獻報導的酵素競爭抑制能力 K_i 值相較下⁽¹⁰⁴⁻¹⁰⁶⁾，重組 *h*-Fuc 酵素明顯為差，可達 1 至 2 個級數。顯示 δ -fuconolactone 對重組 *h*-Fuc 酵素的競爭抑制能力並不明顯和強烈，和對 *h*-Fuc 酵素之結合能力的 Fucose(催化反應之產物)約為相當。因此，推測 *h*-Fuc 酵素催化反應進行時的過渡態結構可能並非以 oxocarbenium ion 的型態存在。另外，透過同位素二級效應 (secondary deuterium kinetic isotope effect) 的相關研究，我們亦可進一步了解酵素催化反應過渡態的真實結構情形。

3-11-2、不可逆性抑制作用

過去近二十年來，針對病毒於糖苷複合體結構中，所合成岩藻糖基化的作用酵素，其各相關不同岩藻糖類衍生物抑制劑已陸續被合成出來；而這類型絕大多為不可逆競爭型抑制劑^(98-100,106-109)。以受質岩藻糖為基質並合以其它各式官能基取代之衍生物，對 α -L-岩藻糖水解除糖苷酶有著極強烈親和力，藉此進入酵素活性中心與催化殘基或相關作用引之胺基酸位置形成共價鍵結中間複合體，使酵素無任何活性催化空間與受質糖作用，達到完成的失活特性。

除了使用於酵素的抑制研究外，其中部分的衍生物已被應用於親和性層析。最典型的不可逆競爭型抑制劑中，於 1985 年所開發出來的 1,5-dideoxy-1,5-imino-L-fucitol (1-deoxy-L-fuconojirimycin，屬於 Glyconojirimycin 一類的抑制劑) 抑制效果較為突出， K_i 值大約在 nanomolar($\sim 10^{-9}$)的水準，對酵素的親和力非常的高⁽¹¹⁰⁾。曾經被利用於純化蛋白質，但因與酵素的親和力作用太高，酵素不易被流洗出來，無法適用於親和性層析⁽¹¹¹⁾。相反的，這些岩藻糖類衍生物的不可逆抑制劑，卻可能為絕佳研究酵素活性中心結構，或直接、間接鑑定影響催化反應過程中何者為催化殘基位置的重要角色。本實驗嘗試以中研院林俊宏老師實驗室所合成之 *O*-hydroxyl-1-(2,3-epoxypropyl)- α -L-fucopyranoside (EPFP) 來進行酵素抑制。因 EPFP 為 α -L-岩藻糖水解除糖苷酶之反應受質結構類似物，於非糖基部分含有一環氧官能基結構；此種抑制劑以其他糖基分子取代之類似藥物，過去也在各相關糖苷水解酵素中被研究，以被用來當作酵素研究活性位置之測試劑^(112,113)。我們預期它會與酵素的重要催化殘基(親核性(nucleophile)或一般酸/鹼(general acid/base)催化胺基酸)產生共價鍵並結合液相串聯式質譜儀-胜肽圖譜(LC/MS/MS-peptide mapping)技術，如此一來就有直接的證據證明，哪一個胺基酸在催化的過程中扮演重要角色。

首先，我們以進行 EPFP 可逆或不可逆抑制作用的測試，將野生株酵素 (100 μ l, 25 μ g/ μ l) 與抑制劑 (20 μ l, 10 mM) 混合，經過一段反應時間後，進行 LC/MS 之酵素分子量分析測試，由圖 3-25 可發現，約 70 % 的野生株酵素分子量由 50892 amu 增加至 51096 amu，彼此間相差一個 204 amu，即 EPFP 抑制劑的分子量，明顯的為一不可逆抑制作用。

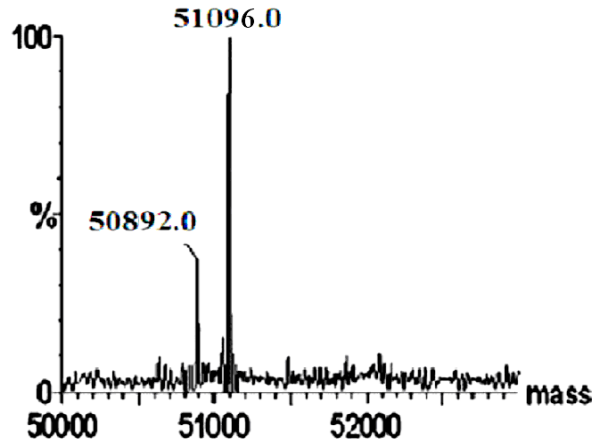


圖 3-25、野生株 *h*-Fuc 酵素與抑制劑 EPFP，作用 4 小時後的質譜圖。(圖譜中野生株 *h*-Fuc 的分子量為 50892Da，*h*-Fuc-EPFP 結合物的分子量為 51096Da。)

為了瞭解抑制劑 EPFP 在酶催化活性中心位置上的抑制速率常數 (k_i)及抑制常數(K_i)。我們於 25 °C 下，分別將固定量的野生株人類 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素 (3.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) 與各不同濃度之抑制劑 EPFP：3.5、7.0、15、22.5、35 mM 進行混合，並隨時間改變取出定量混合液，以受質 pNPF 於標準反應環境條件下進行水解反應，觀測其初始速率的變化值；並與未加抑制劑的對照組一起進行失活反應，反應明確得知活性的下降是酵素與不可逆競爭抑制劑產生鍵結，而非置於室溫下自然的活性喪失。將各組反應數據以 $\ln(v/v_0)$ 對時間的一級速率方程式(single exponential decay) 迴歸作圖，如圖 3-26_A 所示，得到 5 個代表反應速率常數(k_{obs})之斜率值。然後將所得的 5 個 k_{obs} 依 ($k_{obs}=k_i [I] / (K_i + [I])$, $[I]$: EPFP 濃度) 方程式對不同的 EPFP 濃度，以雙倒數作圖並經由線性迴歸，可得抑制速率常數 ($k_i = 0.66 \text{ s}^{-1}$) 及抑制常數 ($K_i = 0.032 \text{ mM}$)，見圖 3-26_B 所示。其對 *h*-Fuc 的抑制能力遠小於 1,5-dideoxy-1,5-imino-L-fucitol (1-deoxy-L-fuconojirimycin) ($K_i = 1 \times 10^{-8} \text{ M}$)，為一 slow-binding 的不可逆競爭抑制劑。當我們將抑制劑 EPFP 作用於其它不同生物來源菌之 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素時，發現有些酵素對此抑制劑不具任何不可逆抑制作用(相關內容請參考本實驗室陳朝勝同學論文⁽⁹²⁾)；而此結果恰巧也反映於一些研究學者的研究報導，在同一類的岩藻糖水解糖苷酵素抑制劑中，對著同為家族 GH-29 的各生物來源 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素卻顯現著不同的抑制作用效果，彼此之間的抑制差

異可達千倍以上⁽⁹⁸⁻¹⁰⁰⁾。截至目前對 *h*-Fuc 酵素所作抑制作用結果，可能推測的原因為酵素之催化中心組成結構或水解反應過程有所不同的演化結果。

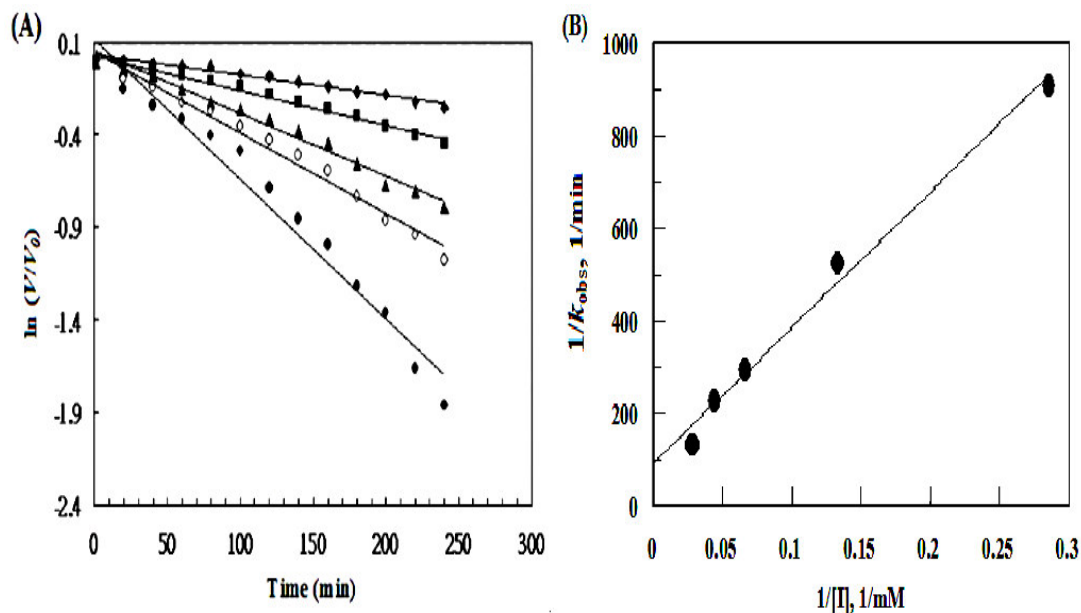


圖 3-26、野生株 *h*-Fuc 酵素與抑制劑 EPFP 之抑制速率常數圖。

(A) 野生株 *h*-Fuc (3.5 μ g/ μ l) 在不同 EPFP 濃度的殘留活性區線圖 3.5 mM (\blacklozenge), 7.0 mM (\blacksquare), 15 mM (\blacktriangle), 22.5 mM (\circ) 和 35 mM (\bullet)。 (B) 由圖 (A) 所得一級速率常數 (k_{obs}) 對抑制劑濃度 (I) 作雙倒數圖得到抑制速率常數 (k_i) 及抑制常數 (K_i)。

在其他類型競爭型抑制劑對 *h*-Fuc 酵素的抑制作用上，它們雖有著與 EPFP 相同的糖基分子結構，但卻無任何不可逆抑制作用反應；加上由液相蛋白分子量之質譜證據，清楚顯示不可逆競爭型抑制劑 EPFP 進入 *h*-Fuc 酵素的催化中心後，於非糖基部分之環氧官能基團與酵素活化中心的某個胺基酸側鏈進行反應鍵結，使 *h*-Fuc 酵素漸失去催化能力。此部份實驗將由後進人員繼續研究探討，若能鑑定抑制劑 EPFP 於酵素作用過程中與催化胺基酸產生鍵結，將是 *h*-Fuc 酵素重要催化殘基判定的最直接證明。因此，在尚未有 *h*-Fuc 酵素晶體結構及標示物之蛋白複合體序列定序的資訊中，對後續鑑定人類 α -L-岩藻糖水解醣苷酵素之催化反應機制與重要催化殘基的研究，我們將採取一般古典酵素動力學方式來加以分析探討。

3-12、人類 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素突變株之純化及活性分析

經由 Quick Change method (Stratagene Co.) 得到的突變株酵素其純化方式和野生株酵素一樣，經過一連串離子交換管柱與凝膠管柱層析後，取得其高純度且經由 SDS-PAGE 分析得知可達 90 % 以上的突變株 *h*-Fuc 酵素，分子量大小為 50 kDa。但因突變株 D225G/N 和 E289G/Q 酵素在純化的過程中，不易觀測而造成產率過低。因此，我們試圖改變這些突變株酵素在蛋白質的表現方式；首先，將這些突變株基因的停止密碼刪除，使其整段基因於蛋白質轉譯過程中，終止於載體 pET22b(+) 上的基因停止密碼，如此，在表現突變株 D225G/N 和 E289G/Q 酵素時，於蛋白質序列之 C 端上增加含有 6-His 的胺基酸胜肽區域，以便於 Ni²⁺-管柱 (HisTrapTM HP) 層析純化。在純化的過程中，含 6-His 胺基酸胜肽區域之 *h*-Fuc 突變株 D225G/N 和 E289G/Q 酵素，與管柱中的 Ni²⁺ 有鍵結引力作用而滯留於膠上，後再以含有 imidazole 的緩衝溶液以 0-500 mM 的沖提梯度，將滯留於 Ni²⁺ 膠上的突變株 *h*-Fuc 酵素沖提下來。所取得酵素純度由 SDS-PAGE 分析得知可達 90% 以上的突變株 *h*-Fuc 酵素，分子量大小為 51 kDa，見圖 3-5_B。分別針對上述純化之野生株與各突變點酵素進行 K_m 與 k_{cat} 值研究比較，以初步觀測各突變點酵素的反應速率變化，在溫度為 37 °C，pH 值 6.8 的 50 mM 磷酸緩衝溶液下，與受質 pNPF 反應並觀測波長 400 nm 其初始反應速率，將各突變點酵素的反應速率值計算整理於表 3-8 中，由初步催化反應速率值，發現 Asp²²⁵ 和 Glu²⁸⁹ 兩突變點可能為酵素的催化重要殘基。

表 3-8、*h*-Fuc 野生株與各突變株酵素對受質 pNPF 反應^a 之 Michaelis-Menten 參數表

Enzyme	k _{cat} (s ⁻¹)	K _m (mM)	k _{cat} /K _m (s ⁻¹ ·M ⁻¹)
Wild-type	17.07 ± 0.03	0.284 ± 0.002	60106
E70G	16.87 ± 0.02	0.281 ± 0.001	60035
E79G	16.28 ± 0.02	0.301 ± 0.001	54086
E135G	15.95 ± 0.03	0.277 ± 0.003	57581
D158G	16.91 ± 0.01	0.282 ± 0.001	59965
D258G	13.46 ± 0.02	0.272 ± 0.003	49485
E275G	16.94 ± 0.01	0.283 ± 0.002	59858
D276G	16.65 ± 0.02	0.279 ± 0.001	59677
D225G	0.003 ± 0.0005	1.038 ± 0.004	2.89
D225N	0.003 ± 0.0004	1.062 ± 0.003	2.82
E289G	0.048 ± 0.004	0.129 ± 0.002	372
E289Q	0.039 ± 0.005	0.106 ± 0.004	367

^a 酵素動力學催化反應條件：37 °C, 400 nm, 在 50 mM 磷酸緩衝溶液, pH 6.8。

3-13、 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素突變株之二級結構與 K_m 關係之探討

我們針對上述所選擇之殘基位置進行突變後，由動力學數據可發現一趨勢，若突變後之胺基酸仍能維持形成氫鍵之能力，如 Asp 置換成 Asn，則 K_m 值將不會有太大的變化，但其 k_{cat} 值卻可下降 10~3,000 倍，這種 k_{cat} 值之下降可能導因於活性區內酵素與受質或反應過渡狀態之中間體之氫鍵的變化。另外，值得注意的是當這些胺基酸失去了形成氫鍵之能力後，如 Asp 置換成 Ala 或 Gly，則其 K_m 值將大幅上升。 K_m 值上升，代表酵素-受質複合體(ES complex)減少，(因 $K_m = (E)(S)/\Sigma(ES)$)，亦即酵素與受質之親和力下降。原因可能有：一為酵素結構發生變化使得活性區之結構不再適合受質結合；另一為單純的酵素與受質間的親和力減弱(因部分氫鍵消失)的關係。為了初步分析這些因素與檢驗突變後之酵素結構，我們以圓二極光譜儀(CD)分析大部分的酵素，結果如圖 3-27 所示，由 CD 光譜發現各突變株 E70G、E79G、E135G、D158G、D258G、E275G 及 D276G 均與野生株相似(雖然其 K_m 值比野生株明顯大許多)推測它們對受質的親和性變化可能主要導因於部分氫鍵消失的關係。由表 3-8 中野生株與各突變株 *h*-Fuc 和受質 pNPF 反應作用後的活性值(k_{cat}/K_m)，發現突變株 D225G/N 和 E289G/Q，分別降為野生株的 1/460~1/200,000，此數值極可能說明 Asp²²⁵ 和 Glu²⁸⁹ 是催化反應中重要殘基團，我們將於後面各章節專門討論此兩胺基酸。

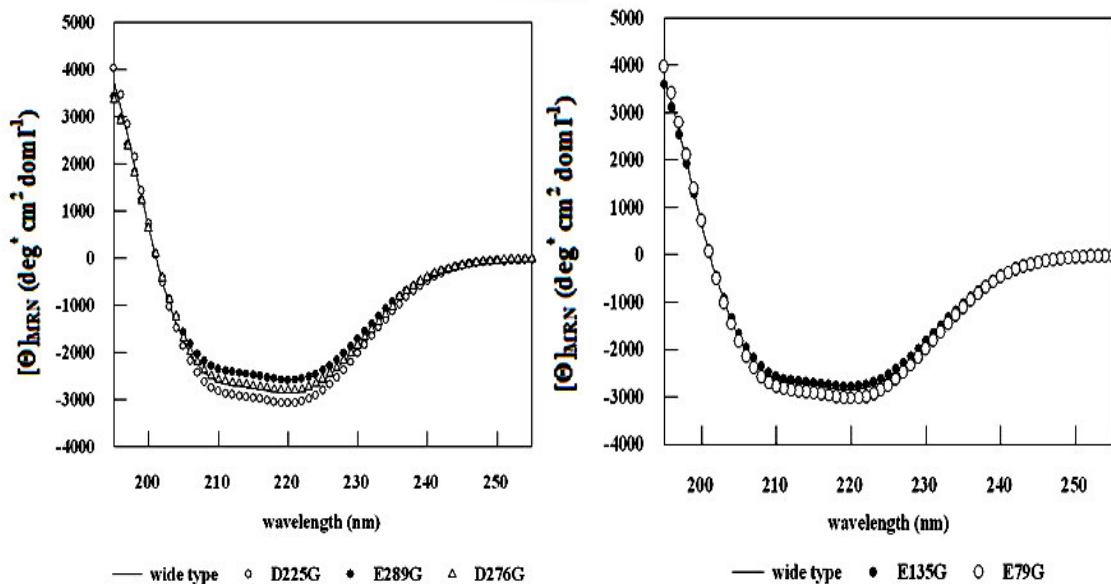
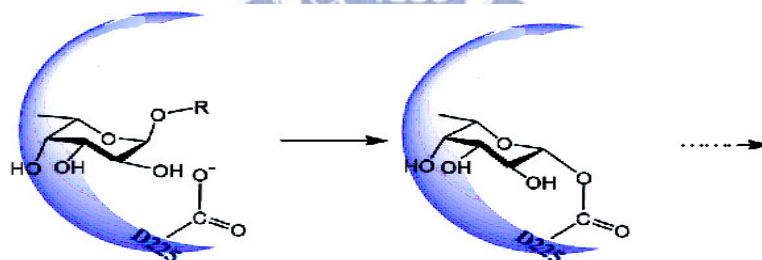


圖 3-27、*h*-Fuc 之野生株與各突變株酵素 CD 光譜比較圖。

3-14、人類 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素親核性催化殘基位置的鑑定

過去對家族GH-29的 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素中親核性催化殘基位置的鑑定也有著許多相關研究，包括：由Withers等人對Tm-fuc酵素之晶體結構和以利用親和性活性位置標示物反應 (active-site affinity labeling)，如 4-nitrophenyl-2-deoxy-2-fluoro- α -fucopyranoside (2F-pNPF) 或 Conduritol-C-epoxide (CCE)與酵素反應，與催化殘基之側鏈羧酸基團產生短暫鍵結的中間體產物，再合以液相串聯式質譜儀-胜肽圖譜技術，鑑定比對重要胺基酸殘基之位置，為蛋白序列-WND²²⁴M-中的D (Aspartate residue)，此法也最為直接且快速的鑑定方式^(56,63)；若將此序列片段對應於*h*-Fuc酵素之所在序列位置為-WSD²²⁵G-。因此，強烈顯示*h*-Fuc酵素之Asp²²⁵(D225)為扮演酵素催化親核性殘基團的位置，但因此類的標示物合成不易。因此，為了證實Asp²²⁵突變株所扮演為親核性胺基酸(nucleophile)？我們以利用定點突變法將Asp²²⁵突變成Asn²²⁵及Gly²²⁵，使其胺基酸側鏈殘基失去含有羧酸基團，並以動力學探討觀測酵素催化反應速率值(k_{cat} 與 k_{cat}/K_m)的改變，藉此推斷它在催化活性位置所扮演的重要角色，如下圖所示：



在進行動力學分析前，我們檢視這些*h*-Fuc突變株酵素的二級結構是否與野生株有差異。因此，將含 6-His 胺基酸胜肽區域之突變株 D225G/N 兩酵素純化後，以圓二極光譜儀(CD)分析其結構的差異，結果由圖 3-27 得知 Asp²²⁵突變後的兩酵素與野生株並無明顯的差異。以確定突變株酵素的失活非結構改變造成。將兩突變株 D225N/G 酵素於 37 °C 的標準反應環境下，與受質 pNPF 在波長 400 nm 下觀測其初始反應速率值。發現兩突變株酵素整體催化反應速率 k_{cat} 值下降 5,600 倍以上，且 K_m 也較野生株增大約 5 倍，如表 3-8 所示。我們針對突變株 D225N 與野生株進行酸鹼度對酵素活性的比較，實驗條件為 37 °C 下，於不同 pH 值的 50 mM 緩衝溶液中(同

章節 3-9 描述)，受質為 pNPF 在波長 348 nm 下觀測其初始反應速率值。由於 D225N 的 K_m 較大，所以我們在受質濃度遠大於 5 倍 K_m 值的條件下進行實驗，故所得之 k 值約等於 k_{cat} 值，以不同 pH 值對 k_{cat}/K_m 做圖即可得其關係圖如圖 3-28 所示。

於前面章節已描述，野生株 *h*-Fuc 在各不同酸鹼度環境下動力學之 pH-profile 為一鐘形曲線 (bell-shaped curve)，反應出二個重要殘基胺基酸調控酵素之催化反應，其第一個 pK_{a1} 的解離值約介於 3.0~4.0 間，與扮演親核性基團胺基酸有密切關係；而第二個 pK_{a2} 的解離值約介於 5.5~7.0 間，則與另一扮演一般酸/鹼催化反應之重要殘基基團有關。但當以定點突變法使 Asp²²⁵ 之側鏈基團少了一個羧酸基團 (即 Asp→Gly/Asn) 時，突變株 D225N 酵素在各不同酸鹼度環境下之動力學，所反映出 pH-profile 已不再呈現與野生株類似的鐘型曲線；當突變株 D225N 在反應緩衝溶液 pH 4.0~6.0 時，酵素催化反應 k_{cat}/K_m 值幾乎無變化近似一水平線，隨緩衝溶液 pH 6.0 增加至 8.0 時，催化反應速率 k_{cat} 值則漸緩慢下降改變，如圖 3-28 所示。顯示突變株 D225N 在 pH 4.0~6.0 時，其催化活性不再受溶液酸鹼度影響，幾乎近似一水平線；乃因催化重要胺基酸失去原有羧酸基團，使 Asp 所處環境已無法允許其保留 pK_a 值之特性，於正常 pH 值下無法呈現解離狀態可作親核性攻擊反應，故於 pH-profile 中無法再呈現與野生株類似的鐘型曲線，亦說明 Asp²²⁵ 在酵素的催化反應為扮演親核性基團角色。

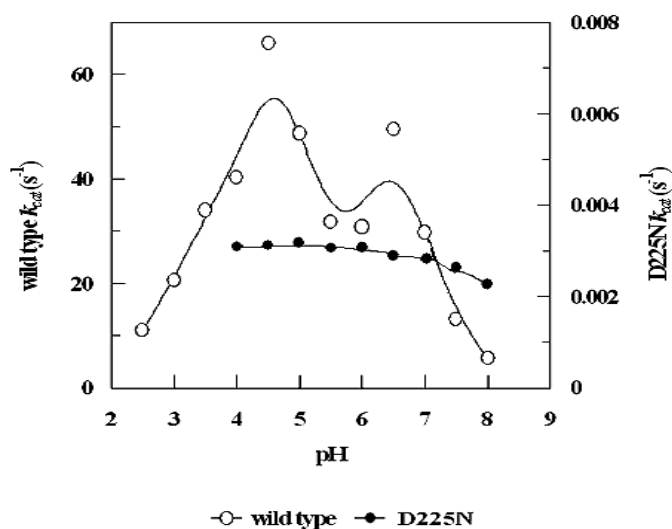


圖 3-28、野生株與突變株 D225N 酵素對受質 pNPF 水解反應之 pH-profile。

從突變株 D225N 酵素之反應活性 pH-profile 曲線圖，得知對扮演親核性基團的胺基酸進行突變後，因失去親核性催化殘基調控酵素催化反應，致使酵素失去催化功能。因此，我們試圖以外加陰離子親核劑如疊氮、甲酸鈉…等，取代酵素上所失去羧酸基團的親核性攻擊反應，觀測是否能使失活的催化活性有所復活。首先，為了解反應受質是否會因外加的疊氮陰離子而有影響，於含有 1 M 疊氮之 50 mM 磷酸緩衝溶液(pH6.8)，37 °C 反應環境條件下，以 1 M 疊氮對兩不同芳香族離去基的反應受質 FPNP 和 pNPF 進行水解反應，結果發現並不具任何催化活性，如表 3-9 所示。此時，我們以純化之突變株 D225N 酵素在外加 1 M 陰離子疊氮的協助催化水解下，觀測到反應速率並無增加的現象；亦發現含 1 M 疊氮的野生株酵素催化反應中，不但沒有增加反應速率值(k_{cat}/K_m 或 k_{cat})，卻有著約~5%的抑制作用(其抑制常數 K_i 為 2.17 ± 0.2 M，參見章節 3-11 抑制作用)。推測可能是野生株的 Glutamate 側鏈及突變酵素中之 Glutamine 和 Aspartic acid 的立體障礙或電荷遮蔽使陰離子無法接近。我們將 Asp²²⁵ 置換成 Gly，以提供足夠大的空間並排除電荷效應，讓陰離子可接近糖-酵素作用空間。將純化之突變株 D225G 酵素於 37 °C 中，置入 1 M 疊氮相同反應環境條件下，進行觀測對兩不同芳香族離去基的受質 FPNP 和 pNPF 的活性復活水解反應，如表 3-9 所示。在受到陰離子親核劑疊氮的催化協助下，突變株 D225G 酵素對糖苷受質 pNPF 之催化反應速率值由無陰離子疊氮協助的 $k_{cat} = 0.003 \text{ s}^{-1}$ 、 $k_{cat}/K_m = 2.9 \text{ s}^{-1}\cdot\text{M}^{-1}$ 增加至 $k_{cat} = 0.0109 \text{ s}^{-1}$ 、 $k_{cat}/K_m = 17.2 \text{ s}^{-1}\cdot\text{M}^{-1}$ ，使突變株酵素整體反應速率 k_{cat}/K_m (或 k_{cat}) 值增加約 5~6 倍。

表 3-9: 為 *h*-Fuc 野生株與突變株 D225G，於含有 1 M 疊氮鈉的 pH 6.8，磷酸緩衝溶液反應環境條件下進行催化反應之動力學數據表

	$k_{cat} (\text{s}^{-1})$	$K_m(\text{mM})$	$k_{cat}/K_m (\text{s}^{-1}\cdot\text{M}^{-1})$	Substrate
Wild type ^a	17.64 ± 0.03	0.278 ± 0.002	63225	FPNP
	16.26 ± 0.03	0.282 ± 0.002	57659	pNPF
D225G ^a	0.0189 ± 0.005	0.592 ± 0.003	31.9	FPNP
	0.0109 ± 0.006	0.635 ± 0.004	17.2	pNPF
1 M NaN ₃ ^b	ND	ND		FPNP
	ND	ND		pNPF

a. 酵素動力學反應條件：以 FPNP、pNPF 為反應受質，在 37 °C，UV 吸收波長 400 nm，含有 1 M 疊氮鈉的 50 mM 磷酸緩衝溶液(pH 6.8)中。

b. 同 a. 之反應條件，無加任何酵素的對照組實驗反應。

由突變株 D225N/G 酵素所反應出失去親核性催化殘基 調控之酵素催化反應，致使酵素失去催化功能。但也因加入的疊氮陰離子親核劑，進入糖-酵素催化作用空間，使自由的電子對取代酵素上的羧酸基團進行親核性攻擊作用，讓失活突變株 D225G 對受質 FNPF 或 pNPF 的催化活性值增加。反應過程的機制與催化產物的生成，可見圖 3-29。在完全去質子化的疊氮條件中，以自身的自由電子對作為親核性攻擊，使反應受質之芳香族離去基離去，此時的催化過程中無酵素-受質共價鍵結物的中間體產生。因此，水解反應後產生 β -fucosyl_azide 之產物，是作為證明 Asp²²⁵ 為 *h*-fuc 酵素中，扮演親核性基團胺基酸的另一重要依據。

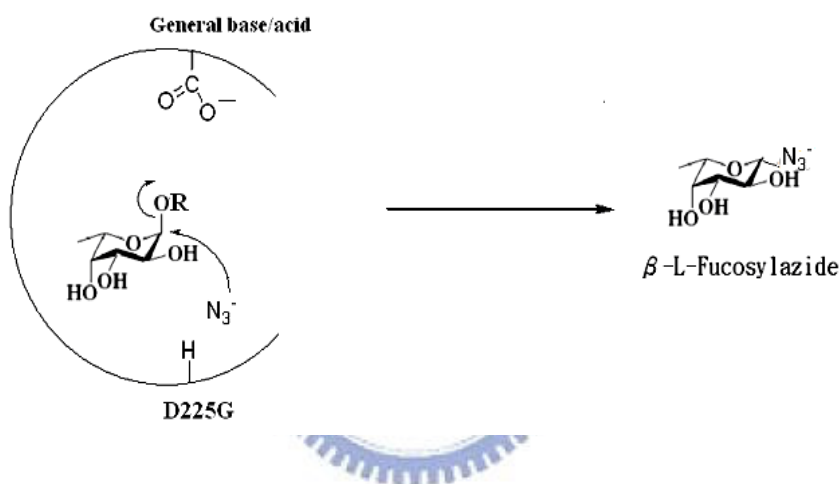


圖 3-29、疊氮於突變株 D225G 酵素之化學復活反應，扮演的催化角色示意圖。

(N_3^- 自身作為親核性攻擊的角色，產物為 β -fucosyl_azide)

為了觀測突變株 D225G 酵素在含陰離子疊氮的幫助催化作用下，是否有 β -fucosyl_azide 之作用產物產生，我們將純化之突變株 D225G 酵素置於含有 1.5 M 疊氮的 50 mM 磷酸緩衝溶液 (pH 6.5) 中，進行復活反應。由於失去羧酸基團的突變株 D225G 使催化反應速率 k_{cat}/K_m 值降低 $\sim 200,000$ 倍以上。若以芳香族離去基 (pKa) 大的反應受質作用只會降低酵素催化反應性與拉長反應時間。因此，選擇芳香族離去基 (pKa) 小的反應受質如 :FNPF，與突變株 D225G 酵素在含有 1.5 M 疊氮的溶液中反應，因外加陰離子疊氮取代酵素對受質 FNPF 的親核性攻擊催化反應，使原失活突變株 D225G 酵素的反應速率增加約 5.7 倍。於實驗的過程中，觀測酵素反應活性的變化，並拉長反應

時間追蹤反應產物的增加量，待受質FNPF幾近作用完後，將反應產物與醋酸酐/吡啶進行保護反應，使岩藻糖上-OH基團變成-OAc保護基團，藉此分離疊氮鈉和酵素…等其他對訊號的干擾。乙醯化產物 β -fucosyl_azide之 $^1\text{H-NMR}$ 圖譜，見圖3-30所示。乙醯化保護之 β -fucosyl_azide於 $^1\text{H-NMR}$ 圖譜中，各吸收峰之化學位移：4.58 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, H-1)，5.03 (dd, $J = 6.0, 12.0$ Hz, 1H, H-3)，5.14 (dd, $J = 4.2, 9.8$ Hz, 1H, H-2)，5.27 (d, $J = 6.8$ Hz, 1H, H-4)，3.91 (q, $J = 7.0, 12.0$ Hz, 1H, H-5)，2.21 (s, 3H, AcO)，2.14 (s, 3H, AcO)，2.05 (s, 3H, AcO)，1.09 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H, H-6)。由突變株D225G/N的動力學反應速率數據、pH-profile和azide-rescue產物的 $^1\text{H-NMR}$ 圖譜分析，推測得知Asp225為人類 α -L-岩藻糖水解醣苷酵素扮演親核性催化殘基之位置。

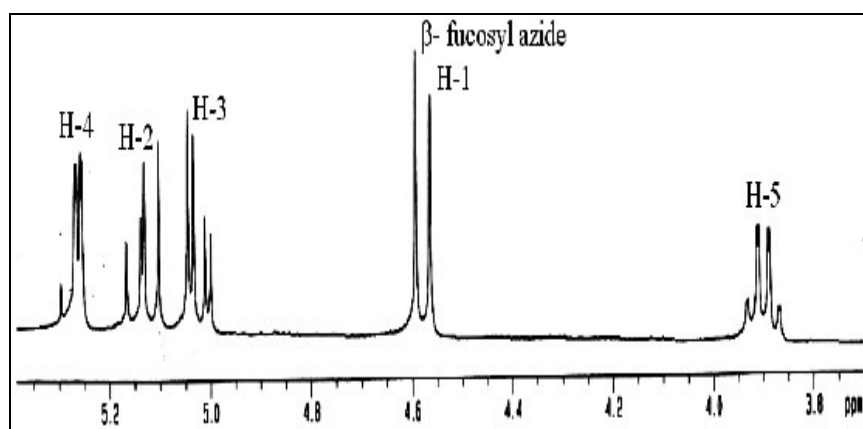
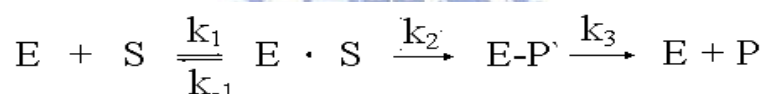


圖3-30、乙醯化的 β -fucosyl_azide反應產物之 $^1\text{H-NMR}$ 圖譜。

3-15、人類 α -L-岩藻糖水解釋糖苷酵素一般酸/鹼催化殘基之鑑定

對於人類 α -L-岩藻糖水解釋糖苷酵素之反應機構已詳細於前述，並鑑定了催化反應中扮演親核基之胺基酸 Asp²²⁵。然而，在上述此家族蛋白質胺基酸序列多重比對的歧異度及缺乏人類 α -L-岩藻糖水解釋糖苷酵素的結構-功能(structure-function)探討，有關其催化反應中另一重要胺基酸所扮演一般酸/鹼催化之研究則尚未明確定論，本論文也將針對此重要而待解的課題進行深入之探討。雖然於家族 GH-29 中，有關真核與哺乳生物所扮演的一般酸/鹼催化之胺基酸從未被報導過，但從已鑑定研究的原核細菌 Tm-Fuc、Ss-Fuc 兩酵素中，可得知胺基酸 Glutamate 是被保留扮演一般酸/鹼催化胺基酸，由雙取代的反應機制得知糖-酵素中間體形成時，需要一般酸之催化來協助離去基離去及一般鹼催化以協助水解糖-酵素中間體。因此，扮演一般酸/鹼催化的胺基酸突變後其動力學數據會有明顯的改變，動力學參數值描述酵素的催化速率，以下面流程代表酵素催化的步驟，而這些參數值改變程度可用以評估扮演一般酸/鹼催化的可能性，簡述如下：



$$k_{\text{cat}} = (k_2 k_3) / (k_2 + k_3)$$

$$K_m = k_3(k_2 + k_{-1}) / k_1(k_3 + k_2)$$

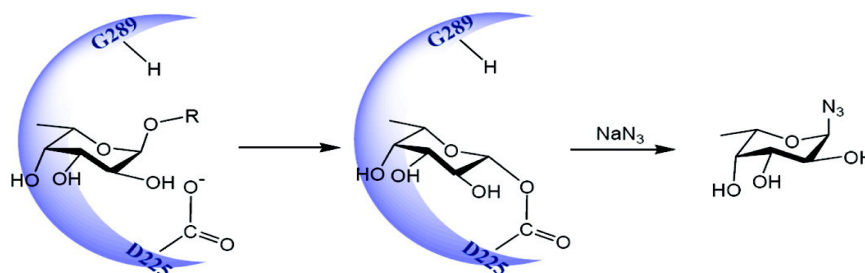
$$k_{\text{cat}} / K_m = k_1 k_2 / (k_2 + k_{-1})$$

1. 由詳細的 pre-steady-state 和 steady-state 的動力學分析，若有大量的糖-酵素的中间體累積， K_m 可能會變小，因 $K_m = (E)(S) / \Sigma(ES)$ ，故當 $\Sigma(ES)$ 增加時， K_m 則自然變小。經由 k_{cat} / K_m 及 k_2 (fucosylation 速率常數) 值可知對於具有差的離去基的受質 (poor substrate)，如 PF，其 fucosylation step (k_2) 相對於野生株步驟明顯變慢；而在對於具有好的離去基的受質，如 CNPF 或 FNPF，由於其 fucosylation step 需要酸基質子協助不多，所以其 k_{cat} / K_m 及 k_2 相較於野生株之下，兩者之值差不多。但是對 defucosylation 步驟 (k_3) 而言，若在缺乏鹼基協助水解反應，則對所有的受質都將變慢。以致速率改變之大小則需視速率決定步驟為何而定。
2. 由酵素的 pH-dependence 活性實驗反映出扮演一般酸/鹼催化胺基酸的游離情形 (即其 pKa)，若突變成非解離性殘基如 Gly 或 Ala 等，將沒有游離狀況產生，其活

性自然不受 pH 影響，因此，檢視作用反應之 pH-profile 可得到相關的證據。

3. 加入疊氮(azide, N_3^-)作為親核劑或其他的親核試劑，如 formate、acetate、bisulfite... 等功能性酸根，對於速率決定步驟是 defucosylation step 的受質，其活性值可以大幅增加，並可能產生 α -L-fucosyl_azide 複合體糖基，產物 α -L-fucosyl_azide 可由 1H -NMR 鑑定之。疊氮加強活性的反應的原因可能有兩點：**(1)** 若速率決定步驟在 defucosylation step 或 partial defucosylation step 的受質才会有加強活性的效應，故對於 fucosylation step 為速率決定步驟的受質，不會明顯增強活性。至於加強活性的程度取決於外加親核劑種類及濃度、 k_2 與 k_3 兩速率常數值大小之差別及離去基離去的難易程度等因素來決定。此種增強效應也可由第一點所述的 K_m 值的變化來驗證，因將扮演一般酸/鹼催化的胺基酸突變掉，明顯地 K_m 會變小，此表示有大量的糖-酵素的中間體累積，但若加入疊氮後，對於差的離去基，如 pNPF，其 K_m 沒有太大的改變，但對於好的離去基，如 CNPF，其 K_m 有明顯的增加，這是因為加入疊氮後，本為速率決定步驟的 defucosylation step (k_3) 速率增加了，故而造成糖-酵素的中間體累積減少，所以 K_m 明顯的增加。**(2)** 加入疊氮使於活性區內酵素與受質的構形變化(conformational change)，而使得疊氮進入活性區內當作親核性基團或當作鹼基，以極化水分子以另外位向之 α -face 攻擊，而分別得到 α -fucosyl_azide 複合體糖基產物與 α -岩藻糖。另外，由 Brønsted plot ($\log k_{cat}$ 及 $\log k_{cat}/K_m$ 及對離去基離去能力作圖) 亦可得知有用的資料供判斷⁽¹¹⁴⁾。
4. 最有利的證據是利用活性位置之催化殘基標示法，結合質譜法以鑑定一般酸鹼催化胺基酸和標示物的位置。

我們將上述的鑑定方法以下圖簡示，並以相關實驗來證明之：



由前面**章節 3-10**所敘述提己之內容，藉由比照 Tm-Fuc 之 3D 複合蛋白晶體中與受質岩藻糖彼此有鍵結引力作用，而於 *h*-Fuc 酵素相對應之胺基酸位置，及 *h*-Fuc 酵素所

進行的二級結構區域中胺基酸序列之分析。推測 *h*-Fuc 酵素中，可能扮演一般酸/鹼催化基團的胺基酸分別可能有 Glu⁷⁹、Asp²⁵⁸、Glu²⁷⁵、Asp²⁷⁶ 和 Glu²⁸⁹。其中位於 *h*-Fuc 酵素中的 Glu²⁷⁵ 和 Asp²⁷⁶ 兩胺基酸，在模擬的二級結構區域上為 random-strand 結構，此區域相對應於 Tm-Fuc 蛋白序列所扮演一般酸/鹼基團 Glu²⁶⁶ 位置 β -平板結構中觀之，彼此間呈現的序列保留度極低。並利用定點突變法，將兩胺基酸分別突變成 E275G 和 D276G 使其失去含有羧酸基團，置於標準反應環境下與受質 pNPF 進行水解反應，觀測到兩突變株 E275G 與 D276G 酵素對於整個反應催化速率 k_{cat}/K_m 沒造成極大的影響，其 k_{cat}/K_m 值分別為 59.86 和 59.68 ($\text{mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$)，顯示仍保留有~98 %的催化活性，經由圓二色性光譜儀分析其結構，見圖 3-27 所示，亦發現此兩突變株酵素之二級結構與野生株 *h*-Fuc 酵素相比較，未有太大的差別改變。因此，排除胺基酸 Glu²⁷⁵ 和 Asp²⁷⁶ 兩位置為 *h*-Fuc 酵素中扮演一般酸/鹼催化基團之胺基酸的可能性。

觀察 *h*-Fuc 酵素所模擬之蛋白結構中，乃是由八個 β -平板結構所構成 TIM-barrel 區域的催化中心，在這中心區域裡相對應於 Tm-Fuc 酵素晶體結構中的 β 4-平板結構上，為扮演 *h*-Fuc 酵素催化反應中親核性基團之胺基酸 Asp²⁵⁵。另外，分別對應於 β 5-和 β 7-平板結構上的 Asp²⁵⁸ 和 Glu²⁸⁹ 兩胺基酸，猜測著極可能扮演一般酸/鹼胺基酸之位置所在。隨後依照實驗章節內容中，所描述各步驟進行兩胺基酸 Asp²⁵⁸ 和 Glu²⁸⁹ 的定點突變與蛋白質純化。兩突變株酵素對受質 pNPF 所進行催化反應速率值(k_{cat} 和 k_{cat}/K_m)之結果顯示於表 3-8。可發現對失去羧酸基團的突變株 D258G 酵素在整個催化反應速率表現上 $k_{cat} = 13.46 \text{ s}^{-1}$ ，與野生株相比下降約為 10%，而 K_m 與野生株相較並無太大的差異，對於整個反應催化速率($k_{cat}/K_m = 49.48 \text{ s}^{-1}\cdot\text{mM}^{-1}$)而言沒造成太大的影響；經由圓二色性光譜儀分析其二級結構，發現亦與野生株酵素無太大的差別。因此，我們認為相對應於 Tm-Fuc 酵素晶體結構中 β 5-平板結構上之胺基酸 Asp²⁵⁸，雖序列上被高度完全保留，但並非位於 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素之活性催化區，預料它可能與催化反應無關。再由表 3-8，我們不難發現胺基酸 Glu²⁸⁹ 各突變株酵素之動力學數據與野生株有明顯之差異，例如： K_m 值大幅下降 2~3 倍，而 k_{cat} 值最大可下降 450 倍以上，這些動力學數據可以帶給我們一個訊息，即胺基酸 Glu²⁸⁹ 在催化活性上可能扮演著相當重要的角色，最可能的是一般酸/鹼催化基團。為進一步釐清其扮演的角色，我們將對其突變酵素進行深入的動力學研究。

3-16、溶液酸鹼度對 Glu²⁸⁹ 突變株酵素的催化活性影響之研究

由分析酵素彼此間多重序列之二級結構模擬比對與動力學反應速率數據等(見圖 3-22 與表 3-8 所示),已探究胺基酸 Glu²⁸⁹ 可能為 *h*-Fuc 酵素中扮演一般酸/鹼催化殘基,為了對此突變點酵素的催化構造有更進一步的認識。所以,我們將針對上述各點特性的描述,設計實驗進行究胺基酸 Glu²⁸⁹ 之各突變株酵素 K_m 與 k_{cat} 的研究探討,藉此推測它在催化活性位置所扮演的角色。實驗的條件為在溫度為 37 °C, pH 值為 6.8 的 50 mM 磷酸緩衝溶液中,以反應受質 pNPF 與各酵素作用,觀測在波長 348 nm 下,其初始反應速率的改變。由於突變株 E289G 酵素的 K_m 值變小,所以在受質濃度大於約 3 倍 K_m 值的條件下進行實驗,故所得之 k 值約等於 k_{cat} 值,以不同 pH 值分別對 k_{cat} 、 k_{cat}/K_m 作圖即可得其關係圖,如圖 3-31 所示。

從圖 3-31_a 顯示出,野生株 *h*-Fuc 酵素之 pH-profile 催化活性曲線圖,呈現一雙峰之鐘形曲線(bell-shaped curve),反應出兩個不同之解離值(pK_{a1} 約在 3.0~4.0 之間與 pK_{a2} 值為 5.5~7.0 之間),分別代表兩重要殘基之胺基酸所調控酵素催化反應。由圖 3-31_b 得知,對失去含有羧酸基團的突變株 E289Q 酵素而言,在 pH-depend 上的催化活性反應亦不再呈現與野生株類似的鐘型曲線。當在 pH 值 5.0-8.0 的反應溶液中,突變株 E289G 酵素對受質 pNPF 之催化反應速率 k_{cat} 值所呈現的 bell-shaped curve,和野生株酵素有很大的不同。顯示胺基酸 Glu²⁸⁹ 少了一催化羧酸基團後,對反應機制也造成嚴重影響。可能原因是 Glu²⁸⁹ 突變成 Gln²⁸⁹ 後,Gln 所處環境已無法允許其保留高 pK_a 值之特性,於正常 pH 值下亦不再呈現解離狀態,故反應活性 pH-profile 曲線圖無法反應其 pK_{a2} ,呈現一似水平直線。此該為移去一般酸/鹼催化基團的突變株酵素所顯現之特性,更因無解離之羧酸基團造成不具極化水分子之特性,故使突變株 E289Q 酵素之 k_{cat} 值下降 10 倍,使催化之第二步驟反應速率急遽下降, $\Sigma(ES)$ 不斷增加, K_m 則變小(見表 3-8 所示)。

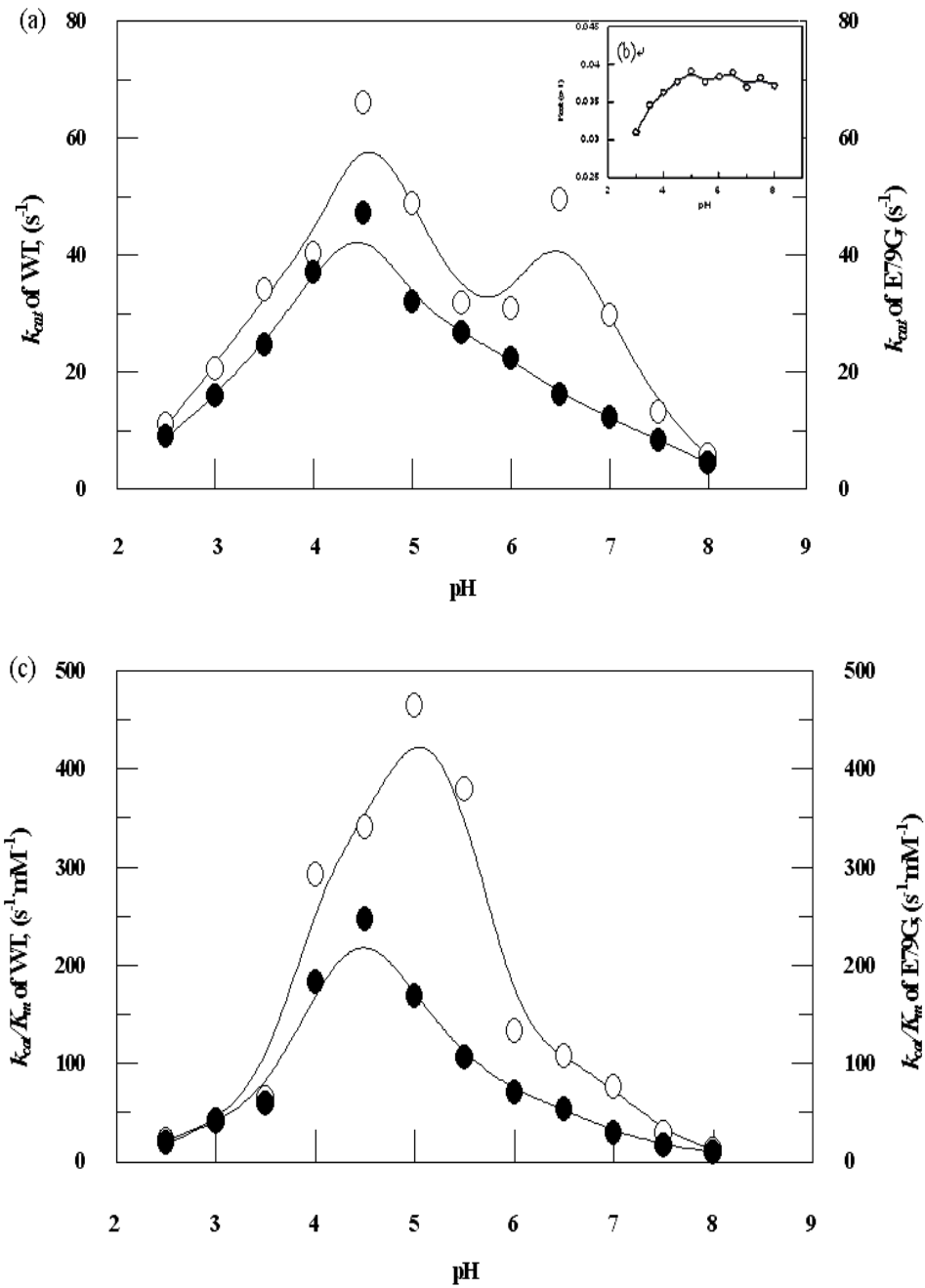


圖 3-31、*h*-Fuc 酵素之野生株(○)與突變株 E289Q (□)、E79G (●) pH-profile 活性變化。

(a)在反應環境 pH 值 2.5-8.0 中，野生株與突變株 E79G 之各反應 pH 值反應活性

k_{cat} 值。

(b)為圖(a)中反應環境 pH 值 3.0-8.0，突變株 E289Q 在各反應 pH 值之反應

活性 k_{cat} 值放大圖。

(c)為圖(a)中反應環境 pH 值 2.5-8.0，野生株與突變株 E79G 之各反應 pH 值反應活

性 k_{cat}/K_m 值。

另外，在**章節3-10**內容中提及在 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素的催化水解反應過程中，有一胺基酸對受質糖之間的氫鍵吸引作用力，或與幫助酵素的一般酸/鹼催化很重要的輔角色，此位置胺基酸在兩酵素中分別為：Tm-Fuc的Glu⁶⁶和Ss-Fuc的Glu²⁹²。而其對應於*h*-Fuc酵素之蛋白序列位置為胺基酸Glu⁷⁹。當以突變株E79G酵素在50 mM磷酸緩衝溶液(pH 6.8)中，對糖苷受質pNPF的水解活性作用與野生株酵素相比較，其反應速率 k_{cat}/K_m 值下降約10 % (如**表3-8**所示)。隨後以該突變株E79G酵素觀測在各不同酸鹼度緩衝溶液中之催化活性，結果發現其反應活性之pH-profile曲線圖，仍呈現一近似鐘形bell-shaped curve曲線，如**圖3-31**所示。由圖中發現在pH 5.0~8.0之間，反應速率 k_{cat} 值所呈現bell-shaped curve，與突變株E289G酵素亦是完全不同之反應結果。因為參與酵素催化反應的一般酸/鹼催化基團，受外在溶液pH高低而顯現出acid/base基團的游離，若移去該基團的突變酵素便無法顯現此作用，即反應的速率 k_{cat} 值會不受溶液之pH值所調控，而呈現一似水平直線，但該突變株E79G酵素在反應活性之pH-profile曲線圖結果上，非是移去一般酸/鹼催化基團所呈現之催化特性。

以**圖3-31**中所觀察，突變株D79G酵素之催化水解作用受溶液之pH值所調控，兩殘基之反應活性解離值分別為 pK_{a1} 約3.3與 pK_{a2} 約5.2。但該突變株酵素在pH值6.0~7.0的緩衝溶液中，酵素催化之反應速率 k_{cat} 值卻明顯較野生株酵素為低。顯示該胺基酸Glu⁷⁹因突變後使側鏈缺少了一羧酸基團，於pH值6.0~7.0範圍下的反應緩衝溶液中，影響反應調控*h*-Fuc酵素之解離值 pK_{a2} ，亦造成水解反應過程之活性有所下降。但此改變的催化活性結果，卻不如Ss-Fuc酵素的Glu²⁹²與Tm-Fuc酵素的Glu⁶⁶對受質糖的水解反應速率來的更為重大影響。即在Ss-Fuc與Tm-Fuc兩酵素上的此位置之胺基酸，當失去含有羧酸基團時，對受質糖-酵素之間氫鍵作用吸引力變弱，或改變側鏈殘基於不同酸鹼值之反應溶液中解離度，造成酵素在催化反應速率之 k_{cat} 、 k_{cat}/K_m 值急遽降低。推測*h*-Fuc酵素中，可能因胺基酸Glu⁷⁹所處於酵素催化中心的組成結構或作用之位置，對影響酵素與糖苷受質之間的水解反應過程中，作用較為小。所以，在*h*-Fuc酵素中扮演一般酸/鹼催化基團為胺基酸Glu²⁸⁹而非胺基酸Glu⁷⁹。

3-17、不同陰離子親核劑對 Glu²⁸⁹ 突變株酵素之反應

由**章節 3-16**的內容描述判斷方法得知，在酵素的活性反應上，當失去酵素上可催化之羧酸基團的胺基酸外，可外加含自由電子對的親核性陰離子，以輔助突變株酵素的催化水解作用。這些具有親核性攻擊作用的陰離子包含有：疊氮、DTT、2-mercaptoethanol、硫代硫酸鈉及功能性酸根(甲酸、醋酸、檸檬酸、磷酸…等)親核性陰離子，可以增加失去催化羧酸基團突變株酵素的水解反應速率，使酵素回復部分活性。在 *h*-Fuc 酵素的 3D 晶體結構未知下，這也是一間接證據證明酵素中扮演一般酸/鹼催化胺基酸位置的方法。於是我們測量以突變株 E289G 酵素和不同濃度反應受質 pNPF ($\gg K_m$)，加入於含有不同濃度(50~3000 mM)親核性陰離子試劑如：疊氮、甲酸…等，的 50 mM 磷酸緩衝溶液(pH6.8)中進行反應，以求得水解反應速率 k_{cat}/K_m 值，如**圖 3-32**所示。由圖中可看出兩種親核性離子試劑對突變株 E289G 酵素之反應速率 k_{cat}/K_m 值的增強效果不一，其中以疊氮可增強 24 倍以上。但甲酸根只可增強 k_{cat} 至 13 倍，且當外加陰離子濃度超過 0.5 M 時，對突變株 E289G 酵素之活性復活反應逐漸降低，可能因高濃度甲酸根離子對酵素在蛋白結構或催化水解之機制過程的改變，致使活性復活作用產生重大影響。另外，在突變株 E289G/Q 酵素的活性復活反應中，除上述兩常見親核性陰離子外，當以外加檸檬酸根陰離子或提高反應緩衝溶液中所含醋酸根或磷酸根離子濃度時，對突變株 E289G/Q 酵素的反應速率 k_{cat} 值卻只增加約 1~2%，遠不及甲酸根與疊氮對該突變株酵素酵素的催化復活作用。

以野生株與突變株 E289G/Q 酵素與反應受質 pNPF 在不同之親核性陰離子的存在下，於不同 pH 值與不同離子組成的緩衝溶液中，對所偵測的各酵素是否有水解反應上的影響，所得反應速率之 k_{cat} 、 k_{cat}/K_m 值結果列於**表 3-10**中。突變株 E289G/Q 酵素置於不同離子組成的各 pH 值緩衝溶液中，對受質 pNPF 的催化反應速率值 (k_{cat}/K_m)相近且均較野生株酵素低 200 倍以上。同時，發現外加的親核性陰離子對於 *h*-Fuc 酵素的復活作用卻略遜於 Ss-Fu 酵素^(65,101)，可確定的是當在相同濃度之反應環境條件下，外加的疊氮陰離子對 *h*-Fuc 及 Ss-Fuc 酵素活性的增強效果，分別為 24 及 80 倍之多；而在其他的酸根陰離子對此兩酵素活性復活的增強效果亦是相同結果。

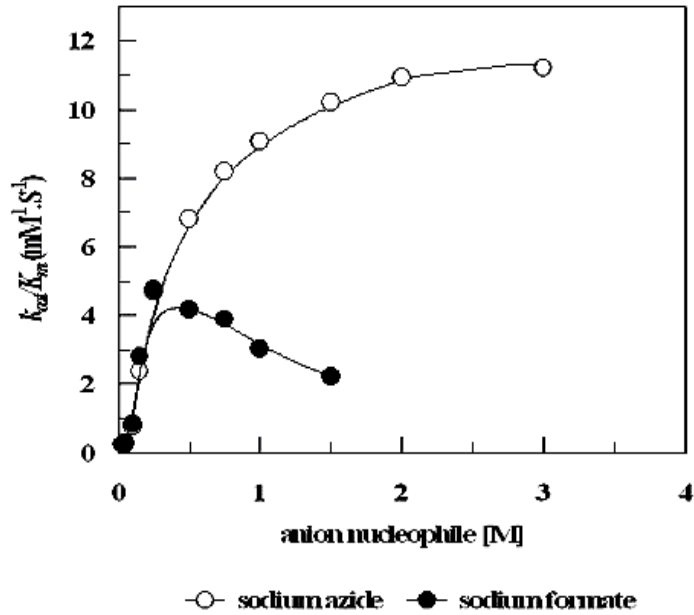


圖 3-32、不同濃度之各陰離子親核劑對突變株 E289G 酵素，反應速率 k_{cat}/K_m 值之影響。

表 3-10: 為 *h*-Fuc 野生株和突變株 E289Q 在不同反應環境條件下，進行催化反應之動力學數據表。

	k_{cat} (s^{-1})	K_m (mM)	k_{cat}/K_m ($s^{-1} \cdot M^{-1}$)	pH	Reaction condition ^a
Wild type	17.07 ± 0.03	0.284 ± 0.002	60106	6.8	phosphate
	48.71 ± 0.03	0.106 ± 0.002	459528	5.0	acetate
E289Q	0.039 ± 0.005	0.106 ± 0.004	367	6.8	phosphate
	0.037 ± 0.006	0.106 ± 0.004	356	5.0	acetate
	1.138 ± 0.002	0.167 ± 0.003	6818	6.8	phosphate + N_3^b
	0.532 ± 0.005	0.127 ± 0.002	4768	6.8	phosphate/formate ^c
E289G	0.048 ± 0.005	0.125 ± 0.003	384	6.8	phosphate
	0.051 ± 0.006	0.129 ± 0.005	399	5.0	acetate
	1.207 ± 0.002	0.166 ± 0.001	7266	6.8	phosphate+ N_3^b
	0.653 ± 0.003	0.140 ± 0.002	4661	6.8	phosphate/formate ^c

a. 酵素動力學反應條件：以 pNPF 為反應受質，在 37 °C，UV 吸收波長 400 nm、348 nm，50 mM 磷酸緩衝溶液(pH 6.8)或醋酸鈉緩衝溶液(pH 5.0)。

b. 在含有 0.5 M 疊氮鈉下反應。

c. 在含有 0.25 M 甲酸鈉下反應。

3-18、疊氮對突變株 E289G 酵素反應之影響

由於親核性之陰離子試劑疊氮可以增加突變株 E289G 酵素水解效率 24 倍，故我們選擇疊氮對具有不同芳香族離去基能力的 aryl- α -L-岩藻糖苷化合物，進行酵素水解反應，以瞭解疊氮在不同濃度下對突變株酵素活性之激化(activation)曲線關係，見圖 3-33 所示，結果發現不同離去基 pKa 的各 aryl- α -L-岩藻糖苷化合物受質其 k_{cat} 值都明顯增加，但所增加的倍率並不相同，而且隨著的疊氮濃度增加至 500 mM 以上， k_{cat} 也會隨著增加而達到持平。這不應是疊氮佔滿所有酵素的鍵結位置而造成的現象，因從每個糖苷受質達到最大的 k_{cat} ($k_{cat\ max}$) 數值皆都不一樣，且對每一個糖苷受質而言，達到一半最大的 k_{cat} 值時，所需疊氮的濃度(half-activation)也都不一致。最有可能的原因是加入疊氮後，加快了岩藻糖-酵素鍵結之過渡態中間體的水解步驟(即 defucosylation step)之反應速率，而使得此步驟不再是速率決定步驟，亦即酵素反應中的 fucosylation step 成為速率決定步驟。因此，添加的疊氮濃度至約 500 mM 以上，不再明顯增加其活性，而速率之增加率亦趨於平坦；而各糖苷受質之最終速率正反映出各糖苷受質於 fucosylation step 反應中之快慢。可以理解的是受質 CNPF 之 pKa 值小於其他糖苷受質，在酵素催化反應的作用條件下，最不需要一般酸/鹼基團之幫助。因此，於突變株 E289G 酵素之催化中(含 500 mM 疊氮)其最終速率 k_{cat} 值較其他受質 FNPF 及 pNPF 為高，其中以 pNPF 之活化倍率最低(下降程度約為 CNPF 的 2 倍)。

此外，我們亦發現疊氮和野生株作用反應時，並沒有使反應速率增加的情形，反而有抑制作用，其抑制常數 K_i 為 2.17 ± 0.2 M (參見章節 3-11 抑制作用)，推測可能是野生株 *h*-Fuc 酵素的 Glutamate 及突變酵素之 Glutamine 等，側鏈立體障礙或電荷遮蔽使陰離子無法接近，而當 Glu289 置換成 Gly，可以提供足夠大的空間並排除電荷效應，故可讓陰離子接近岩藻糖-酵素之過渡態中間體的 α -face。這種親核劑增強突變株 E289G 酵素之催化活性的效應，亦顯示該胺基酸基團應扮演一般酸/鹼催化角色。且從圓二色性光譜儀(CD)得知其二級結構與野生株酵素差不多。由 $^1\text{H-NMR}$ 產物分析得知產生 α -fucosyl_azide 複合體糖基產物出現，故推測胺基酸 E289 於 *h*-Fuc 酵素的機能，應為與受質在水解作用中，扮演一般酸/鹼催化之胺基酸。

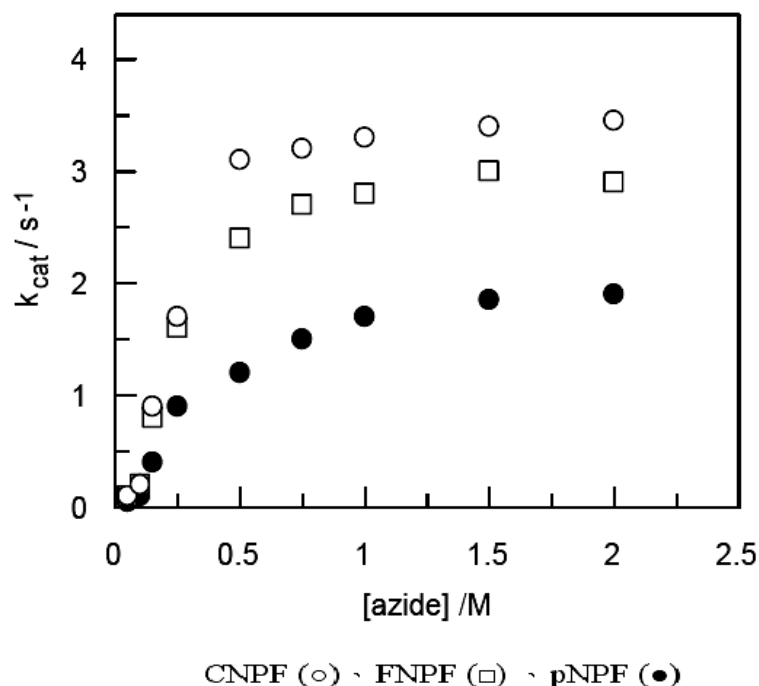


圖 3-33、突變株 E289G 酵素在不同濃度疊氮下，對不同 aryl- α -L-岩藻糖苷化合物的水解反應速率之 k_{cat} 值。

藉由化學活性復活法，加入具親核性的陰離子試劑，如疊氮、甲酸…等，作為競爭型親核劑，以增加酵素所失去重要催化殘基基團之水解步驟速率。對保留構型機制的 *h*-Fuc 酵素而言，催化的雙步驟上要有親核性與一般酸/鹼催化胺基酸來幫助催化水解反應⁽⁸⁸⁾；在前面章節所描述提及，已瞭解當 *h*-Fuc 酵素失去扮演親核性基團的胺基酸 Asp²²⁵ 時，使酵素幾近完全無催化活性；當以加入疊氮取代酵素的親核性攻擊反應，可使"good"的糖基受質(pKa < 7)增加 k_{cat} 值約 10 倍，並由 ¹H-NMR 鑑定分析催化反應後可得到 β -fucosyl_azide 糖基複合體產物。若對另扮演一般酸/鹼催化胺基酸進行突變後，必降低此兩步驟的催化速率常數，可降低此值至野生株的 $1/10^2 \sim 1/10^3$ ，當以加入具親核性的陰離子試劑，如疊氮、甲酸…等，作為競爭型親核劑，以增加酵素第二步驟催化水解速率(defucosylation step)對於好的受質可以增加 k_{cat} 值 25~30 倍；且疊氮和野生株 *h*-Fuc 酵素應沒有速率增加的效應(但卻對野生株酵素有微小的抑制作用)，推測是電荷遮蔽效應使得陰離子無法接近活性中心。將酵素中作為一般酸/鹼催化的胺基酸突變後，於活性中心的疊氮，取代了扮演一般酸/鹼催化胺基酸功能，以自身的自由電子對，親核性的攻擊糖-酵素中間體，並由此得到 α -fucosyl_azide

糖基複合體產物⁽¹¹⁵⁾，其中疊氮對 *h*-Fuc、Tm-Fuc 及 Ss-Fuc…等酵素活性的增強皆是最大，約為 24-80 倍之多。且經 ¹H-NMR 鑑定分析，證實加入疊氮會有 α -fucosyl_azide 糖基複合體產物的產生，見圖 3-34 所示。

圖中顯示藉由 ¹H-NMR 進行長時間追蹤觀察，鑑定突變株 E289G 酵素與反應糖苷受質 CNPF (7.5 mM)，在 27 °C 下，於含有 1.5 M 的疊氮、pD 6.8 的 5 mM 磷酸緩衝溶液中，所催化水解反應之產物立體選擇性的變化。受質 CNPF 在反應前，糖基上碳 1 (C1)位置之 H 原子所雙分裂(doublet)的吸收峰，其化學位移(chemical shift)為 $\delta=5.87$ ppm， $J_{1,2} = 4.0$ Hz。觀測水解作用之不同反應時間點的圖譜掃描，初始後的反應時間可偵測到 α -form 岩藻糖分裂吸收峰的產生，其糖基分子上碳 1 位置質子之化學位移為 $\delta = 4.48$ ppm， $J_{1,2} = 3.9$ Hz。隨作用時間的增長， α -form 岩藻糖分裂吸收峰強度亦增加，並產生另一 β -form 岩藻糖的分裂吸收峰訊號，糖基分子上碳 1 位置質子的化學位移則為 $\delta = 5.12$ ppm， $J_{1,2} = 8.1$ Hz。經 4 小時的催化反應作用後，有一新雙分裂吸收峰的產生，此分裂訊號即 α -fucosyl_azide 之作用產物，其化學位移則為 $\delta= 4.68$ ppm， $J_{1,2} = 4.2$ Hz。由圖 3-34 中得知有 α -fucosyl_azide 糖基複合體之出現，但有趣的是於 *h*-Fuc 之活化反應中， α -L-fucosyl_azide 並非唯一產物，另一主要產物為 α -L-岩藻糖出現(80%，含其 muturotation 後之 β -L-岩藻糖)，當我們使用其他的反應受質 pNPF 與突變株 E289G 酵素反應，隨時間觀看產物皆都會有兩個產物出現，可見疊氮之存在並非僅扮演親核劑以攻擊岩藻糖-酵素鍵結之中間體，而更明顯的功能是扮演一般鹼催化，以極化水分子增進岩藻糖-酵素之中間體之水解，因此， α -L-岩藻糖為另一主要產物。而且當岩藻糖與疊氮並存於野生株 *h*-Fuc 酵素中時並無 fucosyl_azide 糖基複合體產物產生。可見此兩產物是由糖苷受質 CNPF (或 pNPF)經突變株 E289G 酵素催化並藉由兩種催化型態而得，這兩種型態作用機制示意圖，請見圖 3-35 所示。我們推測會有兩種產物出現的原因是：疊氮進入活性位置進行增強水解速率，也同時誘導出受質與酵素的另一個鍵結模式(binding mode)，而此模式提供出一個空間使另一個酸基去極化水分子，讓水分子有足夠的親核力，行水解反應而放出 α -L-岩藻糖，此則需進一步的研究驗證。另一可能的原因是疊氮除扮演親核性攻擊外，亦可扮演一般鹼催化之功能。

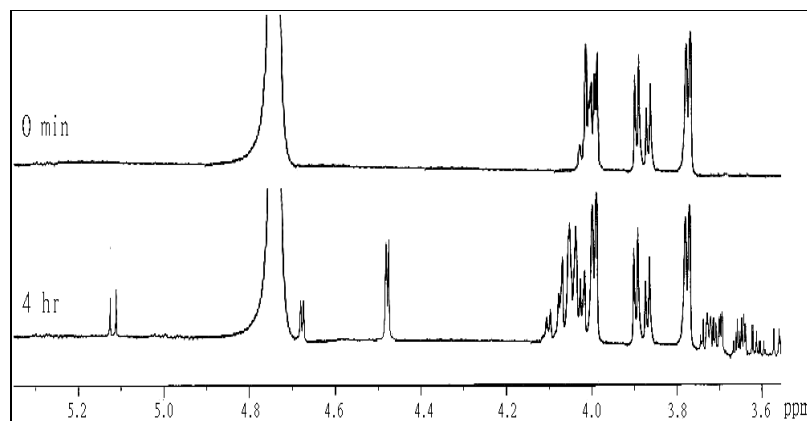


圖 3-34、突變株 E289G 酵素在親核性陰離子疊氮下，與受質 CNPF (7.5 mM) 於 27 °C、pD 6.8 隨時間作用之 $^1\text{H-NMR}$ 光譜圖。

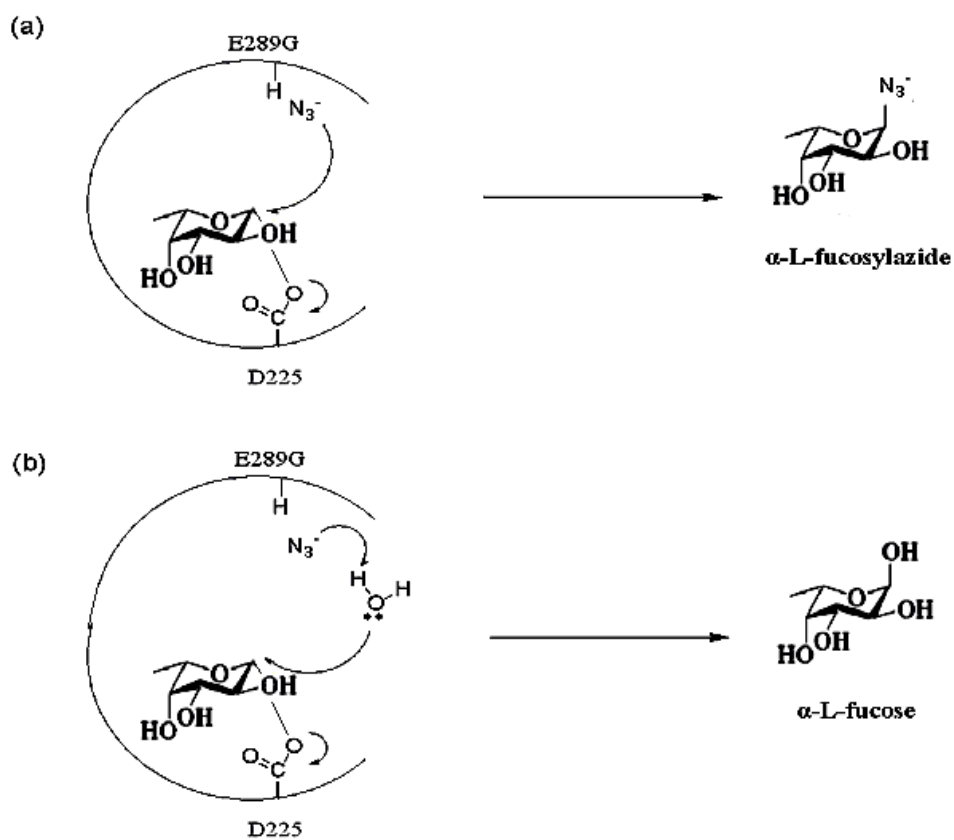


圖 3-35、疊氮於突變株 E289G 酵素之化學復活反應中可能扮演的角色。

(a) N_3^- 自身作為親核性攻擊的角色，產物為 $\alpha\text{-fucosyl_azide}$ 。

(b) N_3^- 作為鹼基以極化水分子行親核攻擊，產物為 $\alpha\text{-fucose}$ 。

3-19、突變株 E289G 酵素之 Brønsted plot 探討

由於突變株 E289G 酵素對 pNPF 的 k_{cat} 比野生株酵素少了 450 倍，且 K_m 比野生株酵素減少了 3~4 倍，為了更進一步證實我們的想法，我們針對突變株 E289G 酵素，進行與不同芳香族離去基受質之水解反應，將許多含有不同芳香族離去基之受質，例如：CNPF、FNPF、pNPF、MeNPF、mNPF、pCPF、PF 等，於相同的反應系統中(50 mM 磷酸緩溶液，pH 6.8，37 °C)做活性測試，分別求出酵素對這些糖苷受質的 K_m 及 k_{cat} 值，結果列於表 3-11 和表 3-12。以突變株 E289G 酵素，在含有或無外加疊氮親核性陰離子條件下，對不同芳香族離去基受質水解反應之 K_m 及 k_{cat} 計算結果。

表 3-11、突變株 E289G 對各不同芳香族離去基岩藻糖苷化合物之 K_m 與 k_{cat} 值 ^a

Substrate	pKa	k_{cat} (s^{-1})	K_m (mM)	k_{cat}/K_m ($s^{-1}\cdot mM^{-1}$)	log k_{cat}	log (k_{cat}/K_m)
CNPF	5.42	0.148	0.052	2.846	-0.829	0.454
FNPF	6.20	0.112	0.078	1.436	-0.951	0.157
pNPF	7.18	0.048	0.125	0.384	-1.319	-0.416
MeNPF	7.42	0.010	0.201	0.049	-2.002	-1.309
mNPF	8.39	0.003	0.174	0.018	-2.523	-1.745
pCPF	8.49	0.002	0.326	0.007	-2.698	-2.155
PF	9.99	0.00013	0.405	0.0003	-3.886	-3.523

a. 反應條件: 50 mM 磷酸/100 mM 氯化鈉之緩衝溶液, pH6.8, 37 °C。

表 3-12、突變株 E289G 在含 0.5 M 疊氮 ^a 下，對不同離去基受質反應之 K_m 及 k_{cat}

substrate	pKa	k_{cat} (s^{-1})	K_m (mM)	k_{cat}/K_m ($s^{-1}\cdot mM^{-1}$)	log k_{cat}	log (k_{cat}/K_m)
CNPF	5.42	3.386	0.221	15.323	0.601	1.185
FNPF	6.20	2.129	0.202	10.540	0.328	1.023
pNPF	7.18	1.017	0.157	6.476	0.008	0.811
MeNPF	7.42	0.119	0.317	0.376	-0.923	-0.424
mNPF	8.39	0.042	0.216	0.200	-1.376	-0.700
pCPF	8.49	0.031	0.374	0.083	-1.508	-1.081
PF	9.99	0.001	0.462	0.002	-2.997	-2.698

a. 反應條件: 50 mM 磷酸/100 mM 氯化鈉之緩衝溶液, pH6.8, 37 °C。

將突變株之酵素對不同芳香族離去基受質所求得的 k_{cat} 與 k_{cat}/K_m 值以線性能量關係(linear free energy relationship)作圖，可得 Brønsted plot，因期能比較疊氮陰離子的存在與否對酵素水解反應的影響，我們加入 500 mM 的疊氮陰離子，以同樣的作用條件，求得相對應之 Brønsted plot，結果見下列圖 3-36 和圖 3-37 所示。

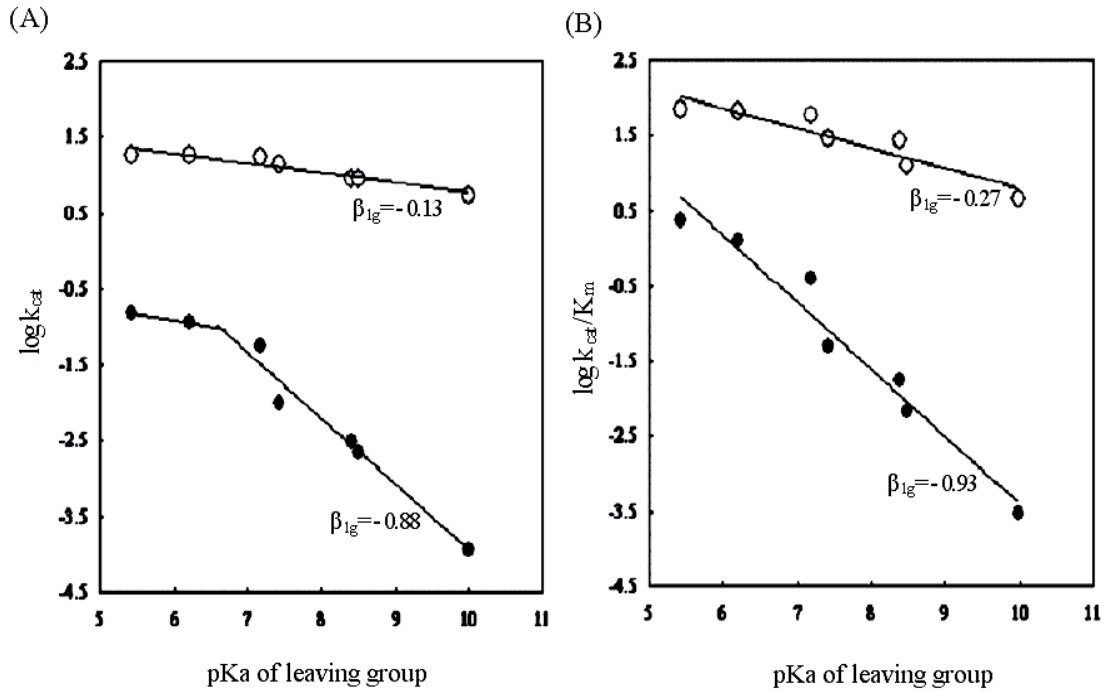


圖 3-36、*h*-Fuc 野生株(○)與突變株 E289G(●)酵素之 Brønsted plot。

承接表 3-5 和表 3-11 之作圖，(A)以 $\log k_{cat}$ 對 pKa，(B)以 $\log k_{cat} / K_m$ 對 pKa。

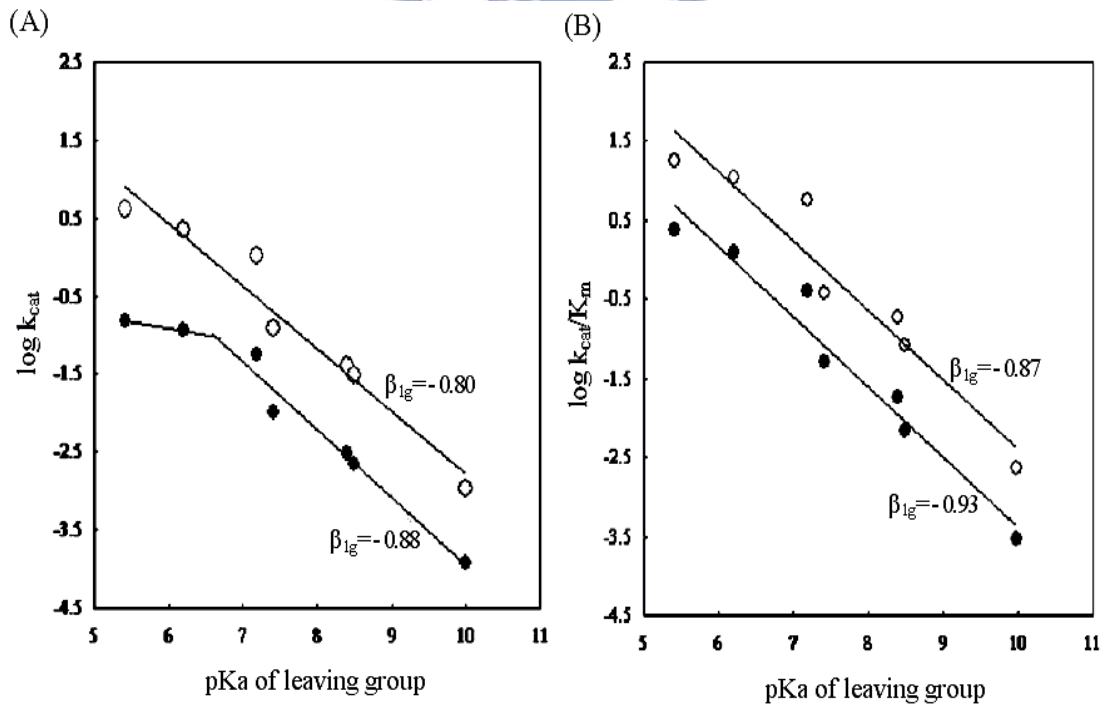


圖 3-37、突變株 E289G 在(●)：沒有疊氮與(○)：500 mM 疊氮下之 Brønsted plot。

承接表 3-11 和表 3-12 之作圖，(A)以 $\log k_{cat}$ 對 pKa，(B)以 $\log k_{cat} / K_m$ 對 pKa。

當我們要進一步探討突變株 E289G 酵素和反應機制相關的 Brønsted plot 時，我們必須先了解野生株酵素的 Brønsted relationship，其為單一線性關係圖(參考圖 3-36_A 及圖 3-36_B)。顯示野生株酵素與不同離去基之糖苷受質反應時，其催化反應的保留構型機構不變，在酵素催化反應速率 $\log k_{cat}$ 值上，亦無隨不同芳香族離去基 pKa 值大小之受質的改變而有太大的變化，Brønsted plot 為近似水平線($\beta_{lg} = -0.13$)。但就以反應的 $\log k_{cat}/K_m$ 值觀察，發現其 $\log k_{cat}/K_m$ 與 pKa 作圖的 β_{lg} 值為 -0.27 ，表示說當酵素與受質結合後把受質催化的反應速率 k_{cat}/K_m 值下降約 2 倍，酵素與糖苷受質結合後，酵素催化反應的過渡狀態上大部分電子轉移到糖基部分之一號碳(C1)原子上，使糖基與離去基鍵結之 C-O 鍵只有少許之斷裂，造成酵素與芳香族離去基 pKa 值小於 7 的"good"受質和 pKa 值大於 7 的"poor"受質反應時， $\log k_{cat}$ 值並沒有太大的變化，即表示反應之速率決定步驟與離去基離開的難易有關，故 fucosylation 應為速率決定步驟(rate-limiting step)。

將 *h*-Fuc 酵素之胺基酸 Glu²⁸⁹ 以定點突變成 Gly²⁸⁹ 時，如圖 3-36_A 所示，顯示出突變株 E289G 酵素與不同離去基之糖苷受質反應時，在催化反應構型雖維持不變，但突變株酵素的水解反應速率 $\log k_{cat}$ 與 $\log k_{cat}/K_m$ 值均較野生株酵素為降低，水解反應的速率決定步亦隨不同芳香族離去基 pKa 能力大小之糖苷受質而有所改變。當以突變株 E289G 酵素與芳香族離去基 pKa 值小於 7 的"good"受質進行反應時， $\log k_{cat}$ 與 pKa 作圖的 Brønsted plot 並無太大的變化(即 $\beta_{lg} = -0.15$)；反之，當與芳香族離去基 pKa 值大於 7 的"poor"受質作用時，反應 $\log k_{cat}$ 值隨著糖苷受質的芳香族離去基 pKa 值增加而漸漸變小，Brønsted plot 所得的斜率，即 β_{lg} 值為 -0.88 。顯示失去催化羧酸基團的突變株 E289G 酵素，降低了對糖苷受質的催化水解速率；並影響突變株酵素在水解反應上的速率決定步驟。當突變株 E289G 酵素與芳香族離去基 pKa 值小於 7 的"good"受質進行反應時，失去催化羧酸基團的幫助其突變酵素排除電荷效應使大量電子無法轉移到離去基之氧原子上，但這些"good"糖苷受質仍受突變株 E289G 酵素上扮演親核性基團的攻擊反應，使這些強芳香族離去基的糖苷受質仍可輕易離去， $\log k_{cat}$ 值無太大的變化，致使在此突變株酵素催化作用之第二步驟(defucosylation step)變為反應的速率決定步驟。同時，也因催化步驟中扮演一般酸/鹼催化基團的不存在，使突變株 E289G 酵素與受質反應後，造成 β -L-岩藻糖-酵素鍵結之中間體的累積現象，而致使其酵素再無活化中心與其他受質進行作用能力，讓下一個催化的

fucosylation step 更難進行(此結果將於下章節 3-20 中描述)。對於"poor"受質的催化水解作用上，不但因酵素上扮演一般酸/鹼催化基團的不存在，這些"poor"糖苷受質與突變株 E289G 酵素，置於 pH 6.8 的緩衝溶液中進行水解反應，所求得 $\log k_{cat}$ 與 $\log k_{cat}/K_m$ 的 Brønsted plot 之斜率 β_{1g} 值分別為-0.88 與-0.93，顯示這些 pKa 值大的芳香族離去基更不容易離去。所以，在催化反應上的速率決定步驟變為 fucosylation step。

又因加入疊氮陰離子於突變株 E289G 酵素的催化反應時，對於差的離去基，如 MeNPF、mNPF...等， k_{cat} 有被疊氮些許增強(見表 3-11 與表 3-12 之比較)，但以 $\log k_{cat}$ 及 $\log k_{cat}/K_m$ 所得之 Brønsted plot 斜率 β_{1g} 值分別為-0.80 與-0.87，如圖 3-37 所示，與未加疊氮的突變株 E289G 酵素之催化反應是極相近，原因是差的離去基其速率決定步驟已在 fucosylation step。對於好的糖苷受質而言，其 k_{cat} 皆會上升達 20~30 倍之多，而增強的倍率取決於受質對 general acid (質子供給者)的依賴程度，顯示在有加疊氮陰離子環境下，fucosylation step 是速率決定步驟。另外，我們從圖 3-37 不管有無疊氮下，可以看出突變株 E289G 酵素的 $\log k_{cat}/K_m$ 對受質離去基 pKa 的 β_{1g} 值，沒有很大的差異。當加入疊氮後，對好的離去基而言，其 K_m 變大了，這是因疊氮增強其水解速率(defucosylation step k_3)，而造成酵素與受質糖的過度狀態中間體變少了，才使得 K_m 變大，而 k_{cat}/K_m 的意義代表酵素與受質結合後之離去基離去(不可逆反應)的效率(fucosylation step k_2)，故此圖更證明了疊氮是對 defucosylation step 行增強反應，而對 fucosylation step 影響甚小，而且此增強效應改變了速率決定步驟，即從 defucosylation step 到 fucosylation step。

3-20、質譜儀鑑定突變株 E289G 酵素與受質反應作用之中間體

若胺基酸 E289 為 *h*-Fuc 酵素的一般酸/鹼催化基團，我們以定點突變方式將此位置的胺基酸 Glu 轉變成 Gly，使其失去催化能力的羧酸基團。在動力學的分析上，將因酵素水解反應中 defucosylation step 速率下降而產生岩藻糖-酵素鍵結之過渡態中間體產物的累積現象，此可由突變株 E289G 酵素之 K_m 值變小得到佐證。為了進一步證明胺基酸 E289 是否為 *h*-Fuc 酵素的一般酸/鹼催化基團，我們以液相串聯質譜儀測量突變株 E289G 酵素與受質 pNPF 反應後，是否有岩藻糖-酵素鍵結之過渡態中間

體的累積產物。首先，將純化過之突變株 E289G 酵素(濃度約為 36 $\mu\text{g/ml}$)，加入以 20 mM 磷酸緩衝溶液(pH 6.8)所配置之 9 mM 糖苷受質 pNPF 反應液，置於 37 $^{\circ}\text{C}$ 中反應 8 小時，後以液相串聯質譜儀進行蛋白質分子量分析。由圖 3-38 顯示在 8 小時內至少已有 70 %之突變株 E289G 酵素已被 pNPF 標示化，其分子量為 51797 amu，比未標示突變株 E289G (51650 amu) 的分子量多出 147 amu (實驗誤差範圍內)，多出的分子量即為標示物(岩藻糖，Fucose)的分子量。此圖說明 *h*-Fuc 酵素催化反應機制中的 defucosylation step 因無催化殘基作用，使得反應速率降至極緩慢，造成短暫有岩藻糖-酵素鍵結之過渡態中間體的累積生成，證明在 *h*-Fuc 酵素中，胺基酸 Glu²⁸⁹ 即為扮演一般酸/鹼催化重要基團。

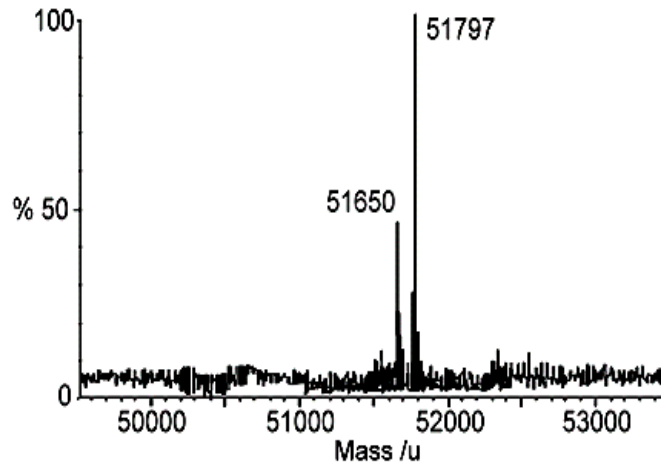


圖 3-38、突變株 E289G 酵素與受質 pNPF 反應 8 小時後的蛋白質分子量質譜分析圖。

第四章 結論

1. 將不含訊號胜肽(signal peptide)的人類肝細胞組織 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素(*h*-Fuc) 基因重組建構於 pET22b(+)表現載體上，並以大腸桿菌 BL21(DE3)表現系統，於 pH 6.0 培養基中誘導表現。透過蛋白質層析管柱純化後可取得均質度達 95 % 重組之人類 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素，其單體的分子量約為 50 kDa。為目前第一個最簡單且方便取得人類 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素的一套流程。
2. 將純化之 *h*-Fuc 酵素與受質 pNPF 進行催化水解反應，酵素最佳的反應條件在 pH 3.5 ~ pH 5.5，而酵素之最佳穩定度在緩衝溶液 pH 3.0 ~ pH 6.0 之間。酵素反應催化活性最佳溫度為 70 °C，於溫度 25 °C ~ 55 °C 之間呈現最佳酵素熱穩定性。在二價金屬離子對 *h*-Fuc 酵素之催化活性反應中，並無影響。除了 Hg^{2+} 離子、DTT 和還原試劑 2-mercaptoethanol 外，對 *h*-Fuc 酵素有完全的抑制作用，乃因 Hg^{2+} 離子與酵素內自由的 Cys 胺基酸之硫鍵結作用，破壞酵素結構，使得酵素失去原有催化作用。
3. 以 pNPF 為反應基質在 pH 5.0 的環境下進行活性分析，其 K_m 及 k_{cat} 分別為 0.105 mM 和 48.6 s^{-1} 。相較自人類肝臟萃取的原生 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素($K_m = 0.43$ mM, $k_{cat} = 16.3 \text{ sec}^{-1}$)，重組酵素的催化能力(k_{cat}/K_m)約為肝臟原生酵素的 12 倍。
4. 以不同糖苷受質與酵素進行催化反應，在反應系統內加入相同比例之甲醇與水，以 $^1\text{H-NMR}$ 光譜得知酵素有轉糖反應，並以構型保留的機制進行催化，並且依據產物之比例可知其與各不同糖苷受質催化反應經由相同的反應中間體。因此，推測 *h*-Fuc 酵素催化反應為保留構型之兩步驟取代水解反應。
5. 根據 *h*-Fuc 酵素之反應活性 pH-profile 曲線圖，重組之 *h*-Fuc 野生株酵素存在兩活性最佳區域，分別是 pH 4.5 以及 pH 6.5。另外，不具任何糖類修飾的重組 *h*-Fuc 野生株酵素 反應活性曲線則稍微的往高 pH 值的區域偏移，這與早期的研究 Alhadef 等人的研究結果相符。但有無糖類修飾之人類 α -L-fucosidase 對蛋白質結

構與酵素催化能力沒有巨大的改變，推測人類 α -L-岩藻糖水解糖苷酵素上醣類修飾主要功能可能在於為維持蛋白質能夠在生物體中於酸性環境下穩定運作。

6. 野生株 *h*-Fuc 酵素所建立的 Brønsted relationship，其為單一線性關係圖，在催化反應的保留構型機構不變，而酵素的化學催化作用步驟之反應速率 $\log k_{cat}$ 值上，亦無隨不同芳香族離去基 pK_a 值大小之受質的改變而有太大的變化，Brønsted plot 為近似水平線 ($\beta_{lg} = -0.13$)。但發現 $\log k_{cat}/K_m$ 與 pK_a 作圖的 β_{lg} 值為 -0.27 ，表示說當酵素與糖苷受質結合後，酵素催化反應的過渡狀態上扮演一般酸/鹼催化胺基酸大部分電子轉移到離去基之氧原子上，使糖基與離去基鍵結之 C-O 鍵只有少許之斷裂，造成各不同芳香族離去基的糖苷受質所反應呈現的 $\log k_{cat}$ 值並沒有太大的變化。因此，推測其催化作用之速率決定步驟應為醣基化(fucosylation)步驟。
7. 我們經由家族 GH-29 酵素胺基酸序列的二級結構模模擬比對分析發現 Tm-Fuc 酵素 “WND²²⁴M” 序列與 *h*-Fuc 酵素 “WSD²²⁵G” 為完全的高度保留。於是將 Asp²²⁵ (D225) 突變成 asparagine (N) 及 glycine (G)。由 CD 光譜可以得知，突變對蛋白質的結構沒有影響，但突變株 D225G/N 酵素的催化反應速率 k_{cat}/K_m 值和野生株酵素相比下降了 3×10^4 和 2×10^5 倍。另藉由加入 1 M 的疊氮陰離子取代對突變株 D225G 酵素中親核性攻擊催化反應，可激化突變株 D225G 酵素之活性約 5.7 倍。顯示胺基酸 Asp²²⁵ 置換成 Gly 後，可提供足夠大的空間讓陰離子接近岩藻糖-酵素之過渡狀態中間體的 β -face。故當突變酵素失去了催化 fucosylation 之能力後，疊氮可扮演親核劑協助反應，而將其作用反應後的產物乙醯化並加以分離，於 ¹H-NMR 中觀測為一 β -fucosyl_azide 圖譜，證明 Asp²²⁵ 為 *h*-Fuc 酵素中扮演親核性催化殘基之位置。
8. 突變株 E289G 之動力學數據與野生株有明顯之差異，其對糖苷受質 pNPF 之反應速率 k_{cat} 值最大可下降 400 倍以上；在 pH 3.0~7.0 之間，突變株 E289G 酵素之活性反應與 pH 沒有關聯，顯示 pH-profile 中無法反應保留其高 pK_a 值之特性，亦無解離之 -COO⁻ 殘基來造成極化之水分子進行水解反應(defucosylation step)，造成受質糖-酵素過渡狀態之中間體產物的累積，並使 K_m 值下降，此與野生株酵素的

bell-shape curve 有很大的不同，顯示胺基酸 Glu²⁸⁹ 可能是扮演一般酸/鹼催化基團。

9. 親核性陰離子(如疊氮、甲酸根)可激化突變株 E289G 酵素之活性，其中以疊氮陰離子影響最大，其 k_{cat} 值可增加 24 倍(pNPF 為受質時)，且於 ¹H-NMR 中觀測到有 α -fucosyl_azide 的產生，顯示胺基酸 Glu²⁸⁹ 置換成 Gly，可以提供足夠大的空間讓陰離子接近糖-酵素中間體的 α -face。故當突變酵素失去了催化 defucosylation 之能力後，疊氮可扮演親核劑協助反應。
10. 當以疊氮對具有不同芳香族離去基能力之 aryl- α -L-岩藻糖苷化合物，與突變株 E289G 酵素進行水解反應時，發現其糖苷受質 CNPF、FNPF、pNPF 之 k_{cat} 值都有增加現象，只是增加的倍率並不相同；且在高的疊氮濃度下，催化反應速率值之增加率會趨於平坦。事實上，由突變株 E289G 酵素之 Brønsted plot 可知，對好的受質而言，defucosylation step 為 partial rate limiting，其 Brønsted constant β_{lg} 值為 -0.15 ~ -0.16。當疊氮陰離子激化了突變株 E289G 酵素的 defucosylation step，便使得 fucosylation step 成為速率決定步驟。
11. 利用液相質譜法研究鑑定突變株 E289G 酵素與糖苷受質(pNPF)進行催化反應後，蛋白質分子量增加了一個岩藻糖基分子量(147 amu)的訊號，乃因 *h*-Fuc 酵素中的失去扮演一般酸/鹼催化之胺基酸 Glu²⁸⁹，降低 defucosylation step 速率，造成受質糖-酵素鍵結的過度狀態中間體產物的累積。

第二部分

家族64的鏈黴菌DIC-108之 β -1,3-葡聚五糖生產水解糖苷
酵素的人造基因選殖、蛋白質表現與突變以及蛋白質結
構和重要殘基的研究與探討



第五章 緒論

5-1、 β -葡聚糖簡介：

真菌多醣在微生物體中存在的形式分為三類⁽¹¹⁶⁾：(1) 胞內多醣 (intra cellular polysaccharides)：提供微生物內部生長所需的能量與碳源；(2) 結構多醣 (structure polysaccharides)：構成微生物菌體的多醣基本形態；(3) 胞外多醣 (extra cellular polysaccharides)：附於微生物細胞外部的黏性物質，以合成胞外多醣(EPS)，而胞外多醣通常附著於細胞表面，或者分泌到胞外的培養基中。在自然界中，胞外多醣通常和動物與植物病原菌的致病性有關，或者為細菌抵抗外界環境或防止噬菌體與原生動物攻擊之用。另外不管在自然生長或人為培養環境中，胞外多醣都為生物膜(biofilms)的主要構形成份，生物膜通常位於固液交界處，為微生物聚集生長所形成。

目前已經有幾種常見微生物多醣，見圖 5-1，以利用生物技術的方法來生產，包括下列：

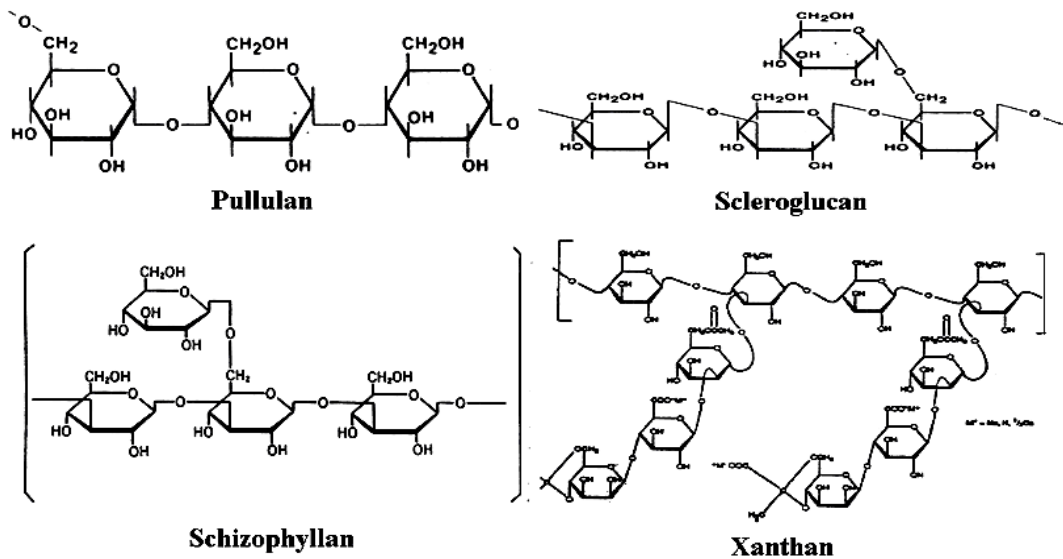


圖 5-1、各類不同結構組成之葡聚糖。

(A) *Aureobasidium pullulans* 可以合成一種 α -D-葡聚糖組成之 Pullulan⁽¹¹⁷⁾，它的結構是由麥芽糖以 α -1,4 鍵結連結為主幹，並於麥芽三糖或者少數的麥芽四糖以 α -1,6 分支鍵結連結而成的聚合物。分子量大約介於 10^3 到 3×10^6 之間，大小主要取決於菌株的種類和當時的生理狀態。Pullulan 並不為大部分的 amylases 所水解，但是 pullulanase 則對其有專一的活性，可用以水解 pullulan 成麥芽三糖(或麥芽四糖)的最終產物，如此對用來生產特定的寡糖具有很大的用處。另外還有其它的一些真菌如 *Tremella mesenterica* 和 *Cyttaria harioti* 都可以生產類似的產物⁽¹¹⁸⁾。Pullulan 具有很高的水溶性，並且在多數陽離子存在的情況下仍然能夠形成穩定的溶液狀態而不會形成膠體。將其脂化之後，可以改善其物理性質，並且更不易為酵素所水解。Pullulan 的一種用途為製造一種抗油、水溶性並且低透氧的薄膜，用以提高食品的香味保留並且維持食品的新鮮度。這種材料的水溶液還可以拿塗佈在食品表層並且無臭無味。Pullulan 也是製造纖維的一種良好材料。另外，在水二相系統中，pullulan 也可以拿來跟 polyethylene glycol (PEG) 形成二相系統，這種系統可以拿來做酵素蛋白質或其他分子的分離純化之用。此外，pullulan 也被拿來做 HPLC 分子篩管柱的標準分子量標準品，而另一種比較特別的用途是，將 pullulan 加入日常的飲食當中，用以促進腸道中雙歧桿菌的生長。

(B) 由 *Xanthomonas campestris* 所生產的 Xanthan 是目前市面上最主要的生物聚合物產品⁽¹¹⁹⁾。結構上是由纖維素骨幹的葡萄糖基，間雜有 D-甘露糖和 D-葡萄糖醛酸的側鏈。而某些突變的菌種或是不同的培養條件，亦會造成產生不同的 Xanthan，它們可能有相同的主幹結構，但是不同的側鏈和乙醯化區域。另外，Xanthan 的流變特性對 Xanthan 水溶液中雙股螺旋結構形成的程度，也有很大的影響。結構中主幹上的三醣側鏈對結構，有非共價性交互作用的穩定效果。此外，*Acetobacter xylinum* 的幾種菌株也會生產類似 Xanthan 的多醣類(acetans)，其中一種在結構的主鏈上，每間隔五糖有側鏈連結。Xanthan 的水溶液具有很高的假塑性，當攪拌停止之後很快就會恢復黏度，並且它們具有很好的懸浮性；在低的攪拌下有很高的黏度。這種多醣類被使用於含水製成的食品中，以改變其流變性質與產品的物理性質。Xanthan 在許多方面都有很好的用途，包括增加香味的釋放與口感、提高不同食品原料例如蛋白質、脂質和多醣類的相容性。此外，亦發現 Xanthan 上面的乙醯基會降低多醣的成膠能力，進而增加成膠所需濃度。嘗試將微生物多醣

類的乙醯基團移除，可以提高多醣的成膠能力，並且減少多醣的用量。

(C) Scleroglucan 是由包括 *Sclerotium rolfsii* 和木材腐生擔子菌類 *Schizophyllum commune* 在內的多種真菌所生產類似的 D-葡聚糖的產品⁽¹²⁰⁾。其主要結構為 β -1,3-D-linked 葡萄糖苷鍵結，另外，還有相當程度的 β -1,6-D-glucosyl residues 支鏈。在不同的聚合物上可以發現不同程度的支鏈鍵結，而這也對它們的溶解度有很大的影響。在 *S.commune* 所生產的 scleroglucan 中，主鏈上每隔三個葡萄糖就會有一個支鏈鍵結，分子量大約在 $1.3 \times 10^5 \sim 6 \times 10^6$ 之間。另外，還有一些葡聚糖，例如：由 *Sclerotium glucanicum* 所生產者，具有比較低的分子量(大約 18,000 Da)，每間隔四或六個葡萄糖會有一個葡萄糖支鏈取代。可溶性的多醣類，其構型以形成三股螺旋結構，則會造成溶液的高黏度現象。

(D) 由細菌與真菌所生產之細菌性纖維素 β -D-葡聚糖，包括 *Agrobacterium* 和 *Rhizobium* 在內的好幾種細菌，在適當的生長條件之下都可以生產多種的胞外多糖。其產物有卡德蘭膠(curdlan)： $(1 \rightarrow 3)$ - β -葡聚糖與地衣多糖(lichenan)： $(1 \rightarrow 3; 1 \rightarrow 4)$ - β -葡聚糖。 β -葡聚糖是一種蘊含有健康與營養且重要的天然多醣體，可依來源不同而分為可溶性與不可溶性，因為在人體中缺少能水解 β -糖苷鍵結 (β -glucosidic)的酵素，所以葡聚糖被視為不易消化的物質，消化道無法代謝難溶的纖維素。因此，不會有熱量的產生⁽¹²¹⁾，利用此特性能應用在熱量控制飲食或控制過度肥胖。不溶的 β -葡聚糖也能幫助預防腸癌⁽¹²²⁾。另外，在燕麥中可溶的 β -葡聚糖則具有較低的升糖反應(glycemic response)的潛能，亦會有較少的低密度酯蛋白和總膽固醇量⁽¹²³⁾。因此，可溶性的 β -葡聚糖能添加在第二型糖尿病患者以及冠狀心臟病患者飲食中具有預防之功效⁽¹²⁴⁾。同時，葡聚糖影響到多種的宿主防衛反應，包括宿主本身的抗腫瘤活性還有改變補體系統的活性。1986 年 Matsuzaki... 等人，分別用具分支的 β -(1 \rightarrow 3)-葡聚糖：卡德蘭膠和具分支的 β -(1 \rightarrow 4)-葡聚糖：纖維素，比較在抑制 Sarcoma 180 腫瘤活性測試，顯示卡德蘭

膠表現較強的腫瘤抑制活性 (>75%)，而纖維素腫瘤抑制活性相對較低 (<32%)。1992年 Demleitner... 等人，將卡德蘭膠的 β -(1 \rightarrow 3)-葡聚糖與地衣多糖的 β -(1 \rightarrow 3;1 \rightarrow 4)-葡聚糖，分別以 Sarcoma 180 檢測其腫瘤抑制活性，結果顯示具有分支的 β -(1 \rightarrow 3)-葡聚糖，較具分支的 β -(1 \rightarrow 3;1 \rightarrow 4)-葡聚糖有更顯著之抗腫瘤活性，這表示主幹是否為 β -(1 \rightarrow 3)-D-glucan 對其抗腫瘤效果有著重要的影響⁽¹²⁵⁾。Lentinan 與 Schizophyllan 都含有具單一個 β -D-glucopyranosyl 分支的 β -(1 \rightarrow 3,6)-葡聚糖，分支度皆為 1/3 (見圖 5-2)，具有顯著的腫瘤抑制活性，而已分別於 1985 及 1986 年在日本被許可通過作為癌症治療用免疫刺激劑。Falch 等 1999 年發現若 scleroglucan 多醣具有相同分子量及分支度，則具有三螺旋構形者，在促進 TNF- α 分泌上有較強的效果⁽¹²⁶⁾。1995 年 Bohn 與 BeMiller 綜合整理指出分支度在 0.2~0.33 之間的 β -1,3/1,6-葡聚糖，其抗腫瘤的效果最為顯著⁽¹²⁷⁾。

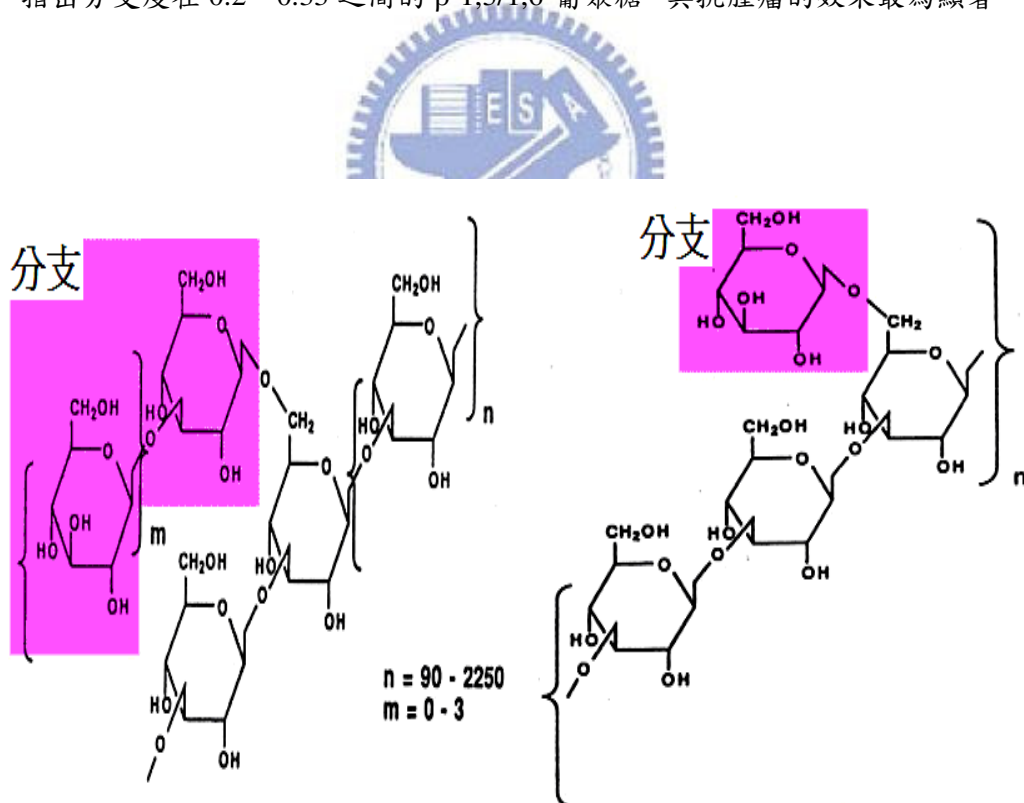


圖 5-2、不同分支度之 β -1,3-葡聚糖結構。

5-2、 β -1,3-葡聚糖應用於醫藥：

自從 1970 年代初以來，發現 β -1,3-葡聚糖對抗腫瘤細胞的文獻報導後，也增加對多醣體·葡聚糖的研究。 β -1,3-葡聚糖是一種專一性的生物反應調節劑，可經由第三型補體受體(CD11b/CD18)促進淋巴細胞，殺死可被抗體所辨識的腫瘤細胞。生物反應調節劑(Biologic Response Modifier, BRM)是抽取自某些微生物的產物，可增強宿主的抵抗力。大部分生物反應調節劑作用是不具特異性(nonspecific)，目前對其反應機制仍不清楚。

β -1,3-葡聚糖已被證明為一種可有效地，增加嗜中性球釋放自由基、吞噬和殺菌的能力；刺激人體免疫系統，免疫細胞以各種型態辨識受體 (pattern-recognition receptors; PRRs) 辨識微生物病原相關分子型態(pathogen-associated molecular pattern; PAMP)，以及對抗腫瘤的生物反應調節劑。具有以 β -1,3-D-葡萄糖六圓環糖(β -1,3-D-glucopyranosyl)單元所組成之 β -1,3-D-葡聚糖，亦包含其他以 β -1,3 糖苷鍵結主鏈架構下伴隨有不同程度的 β -1,6 支鏈鍵結⁽¹²⁷⁻¹²⁹⁾， β -1,3-葡聚糖的排列結構(primary structure)、溶解度(solubility)、分支度(degree of branching, DB)和分子量(molecular weight, MW)...等條件因素下，皆會影響 β -葡聚糖的生物活性。最早研究的 β -1,3-葡聚糖是由酵母菌細胞壁所純化，骨架的部分由 β -(1 \rightarrow 3)-D-葡萄糖互相連接而成，支鏈部分經由 β -(1 \rightarrow 6)-葡萄糖連接出長短不同的分支。

已有超過五百篇的文獻報告：體外(in vitro)試驗已經證實，可溶性或顆粒狀 β -葡聚糖均具有抗腫瘤⁽¹³⁰⁾、抗微生物的能力⁽¹³¹⁻¹³³⁾。某些 β -1,3/1,6-葡聚糖，例如：lentinan (一種抽取自日本菇類 *Lentinus edodes* 的 β -1,3/1,6-葡聚糖)⁽¹³⁴⁾ 或 schizophyllan (一種抽取自裂褶菌 *Schizophyllum commune* 的 β -1,3/1,6-葡聚糖)⁽¹³⁵⁾，均曾經成功的在臨床用為人類抗腫瘤的免疫療法。而在這些臨床或藥理實驗中，發現 β -1,3-葡聚糖會附著至淋巴細胞表面的第三型補體受體 (Complement Receptor Type3, CR3, 又稱為 CD11b/CD18 或 iC3b 的受體)，其結合點更進一步定位為第三型補體受體的 β -次單位

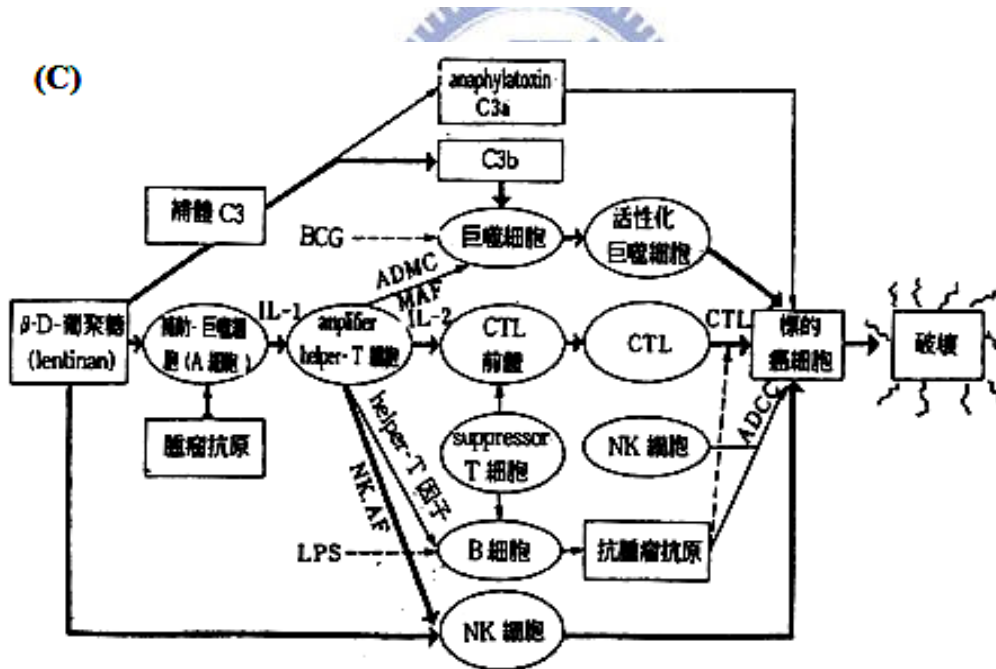
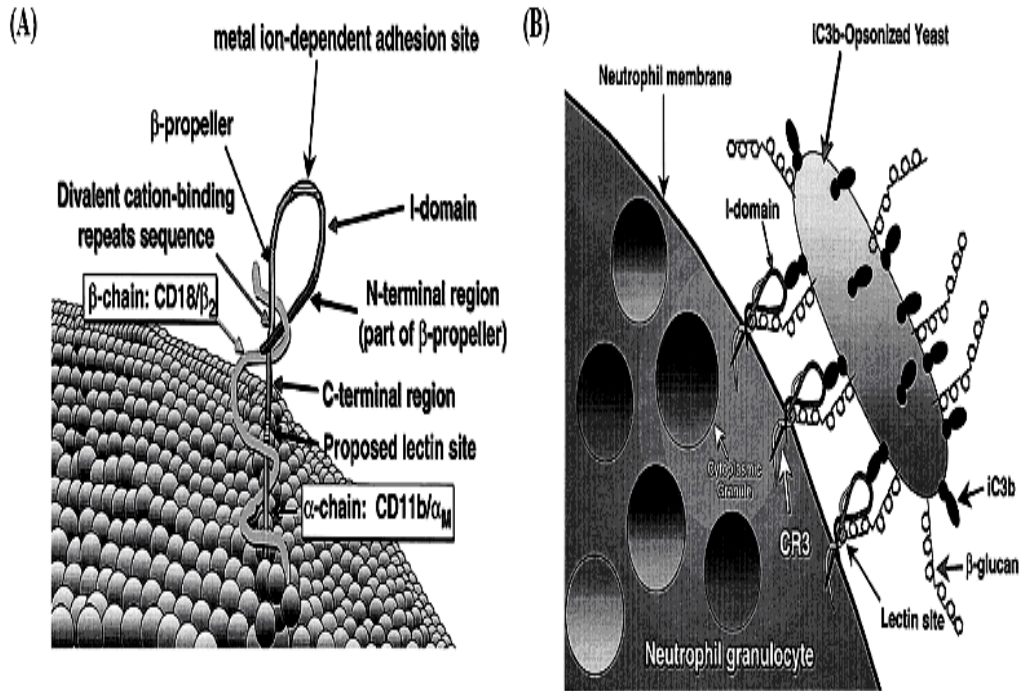
上的外源凝集素(lectin)區域，和補體 iC3b 結合處，見圖 5-3_A、B。Cain 和 Ross… 等人在 1987 年發表的文獻中指出，當吞噬細胞(phagocytic cell)、自然殺手細胞(natural killer cell, NK cell)及嗜中性白血球(neutrophil) 表面上之 CR3 結構，由兩條鏈(α 鏈和 β 鏈)互相纏繞，顯示出 CD11b 的主要結構區域(domain)，為 iC3b 受體(receptor)，又名為 $\alpha_M\beta_2$ -integrin，見圖 5-3_A 與圖 5-3_B：iC3b 調理化之酵母菌(iC3b-Opsonized Yeast) 透過嗜中性白血球上之 CR3 結構而活化細胞毒素活性的可能機制。CR3 結構上的外源凝集素區域(Lectin site)及 I-區域(I-domain)必須分別同時結合至酵母菌細胞壁上的 β -1,3-葡聚糖和 iC3b 結構，才能刺激細胞之吞噬作用(phagocytosis)和細胞毒素之去顆粒作用(cytotoxic degranulation) ⁽¹³⁶⁻¹³⁹⁾。另外，發現 dectin-1 亦為專一性辨識 β -1,3-葡聚糖結構之型態辨識受體，可單獨或與 Toll-like receptors (TLRs)協同辨識 β -1,3-多醣體，此辨識作用進一步影響免疫細胞活性，包括細胞吞噬作用、活性氧的產生。這顯示當外加 β -1,3-葡聚糖和各作用受體結合後，會強化該淋巴細胞或自然殺手細胞，增加其殺死腫瘤細胞的能力⁽¹²⁷⁾。

利用腫瘤老鼠的動物模式證明正常老鼠血清中有低濃度 β -1,3-葡聚糖，可和同基因(syngeneic)或同種異基因(allogeneic)的腫瘤細胞結合之抗體，一旦抗體和腫瘤細胞結合後，會活化補體，讓補體 C3b 附著至腫瘤細胞表面。使用富含 β -1,3-葡聚糖或聚甘露糖可溶性多醣治療老鼠時，可使腫瘤細胞重量減少百分之五十七至百分之九十。年輕的老鼠體內只有微量抗腫瘤抗體， β -1,3-葡聚糖的療效可因同時使用抗腫瘤單源抗體而增加。而 SCID 老鼠因其體內部產生抗體，所以 β -1,3-葡聚糖的療效可藉著注射 IgM 和 IgG 而恢復。研究學者再進一步利用缺少 C3 或 CR3 的老鼠證明， β -1,3-葡聚糖之所以會促使淋巴細胞殺死腫瘤細胞而不破壞正常細胞，是因為只有當抗腫瘤細胞的抗體附著於腫瘤細胞表面後，才會固定補體 C3b， β -1,3-葡聚糖活化的淋巴細胞會經由第三型補體受體殺死腫瘤細胞；正常細胞無 C3b 附著是不會被淋巴細胞所殺死的。

綜合多醣體 · 葡聚糖增強免疫反應的功能 (Immunoblogical Activity of Particulate Glucans)，因多醣體 · 葡聚糖(簡稱葡聚糖)於人體的巨噬細胞有一其受體，

研究發現 β -1,3-葡聚糖不是直接殺死腫瘤細胞，而以有效刺激巨噬細胞、B 淋巴細胞、嗜中性白血球、和自然殺手細胞分泌 β -干擾素、第六型、第八型、和第十二型白血球間質(IL-6、IL-8、和 IL-12)和補體反應，去消滅腫瘤細胞。而一連串刺激與增強人體免疫和網狀內皮系統的功能，其詳細的反應與路徑(見圖 5-3_C)。此外，因為 β -1,3-葡聚糖不會增強裸鼠或去除 T-淋巴細胞老鼠的抗腫瘤作用，實驗結果亦顯示 β -1,3-葡聚糖的抗腫瘤作用，可能亦與促進 T-淋巴細胞的反應有關⁽¹⁴⁰⁻¹⁴³⁾。多年來已有許多研究證實——多醣體·葡聚糖可有效刺激不同實驗動物的多種免疫反應，舉凡下列：

1. 刺激單核球細胞和巨噬細胞進行分裂⁽¹⁴⁴⁾。
2. 增加巨噬細胞的大小、吞噬作用⁽¹⁴⁵⁾。
3. 刺激巨噬細胞分泌多種細胞激 素(cytokine)、附著和趨化反應 (chemotactic activity)⁽¹⁴⁶⁾。
4. 活化補體⁽¹⁴⁷⁾。
5. 在人體或實驗動物均已證實多醣體·葡聚糖可增強巨噬細胞消滅癌細胞的能力^(148,149)。多醣體·葡聚糖於試管實驗中可直接殺死肉瘤細胞或黑色素瘤細胞；於體內促進脾臟細胞和骨髓細胞的分裂⁽¹⁵⁰⁾。
6. 以致死的輻射劑量全身照射動物後，多醣體·葡聚糖可加速該實驗動物的復原，在於多醣體·葡聚糖增強造血功能，顆粒性白血球、單核球或紅血球均快速增生⁽¹⁵¹⁾。
7. 研究證實多醣體·葡聚糖可增強宿主對抗多種細菌、真菌、病毒或寄生蟲感染，如大腸桿菌、金色葡萄球菌、肺炎雙球菌、白色念珠菌、腦炎病毒…等⁽¹⁵²⁻¹⁵⁴⁾。



IL-1: interleukin 1, ADMC: 抗體依賴性巨噬細胞傷害, MAF: 巨噬細胞活化因子, CTL: 細胞傷害性 T 細胞, NK 細胞: 自然性殺戮細胞, ADCC: 抗體依賴性細胞傷害, AF: 活化因子, LPS: 脂多醣

圖 5-3、 β -1,3-葡聚糖(β -1,3-galactan)投藥產生誘發免疫反應的方式與路徑^(137,138)。

5-3、 β -1,3-葡聚糖水解糖苷酵素(β -1,3-Glucanase)之簡介：

構成真菌細胞壁的主要成分為 β -1,3-葡聚糖(β -1,3-glucan)及幾丁質(chitin), 土壤中許多為生物能合成及分泌 β -1,3-glucanase 及 chitinase, 這兩類酵素合併作用能有效的分解真菌的細胞壁, 以達到防治病害的效果, 近年來亦有相當多的文獻報導將這兩種酵素之基因同時殖入菸草或蕃茄後能增強轉殖作物對真菌侵害的防衛能力, 而其應用的範圍:

(A) 植物保護: 此種酵素可以分解真菌的細胞壁, 而達到防治植物病源性真菌的功效。

若將此基因直接轉入植物或是轉殖到根圈微生物, 可提高植物抗病原性真菌的能力。

(B) 醫藥工業: β -1,3-葡聚糖已經在動物體實驗中證實是一種免疫系統的活化劑, 其中以分子量 340-4000 左右的葡聚糖免疫活化的效果較好, 而一般天然界中的 β -1,3-葡聚糖分子量通常高達幾十萬甚至幾百萬, 且為不溶性的, 並非直接應用在免疫系統活化上, 需要由此酵素將巨分子的葡聚糖水解成較低分子量, 才能具有功效。

(C) 食品工業: 目前許多食品中都有添加酵母粹取物, 因酵母細胞壁很難打破, 所以可在萃取酵母時添加此種酵素, 促進其細胞壁的打破^(155,156)。

5-4、 β -1,3-葡聚糖水解糖苷酶的分類簡介：

由於自然界中醣類化合物的立體化學非常繁複，對應而來的是一個相同且具多樣性的糖類水解系統。根據 IUB 酶命名法，醣類水解酶屬於 E.C.3.2.1.X。前三個數字代表此類酶催化糖苷鍵的水解反應機構，第四個數字則反映該酶的受質⁽¹⁵⁷⁾，有時也反映其反應機構。但對醣類水解酶而言，此分類法有其限制性。例如對具寬廣受質特異性(broad substrate specificity)的酶而言，此分類法便不合適。而且有時它並不足以、或無法反映出該酶結構上的特徵。事實上，這種根據受質而提出的命名法也無法反映出各酶來源之物種的演化情形。

β -1,3-葡聚糖水解糖苷酶，已廣泛存在於自然界之細菌、黴菌和植物；一般認為這類酶的催化特性頗為類似。葡聚糖水解糖苷酶屬於水解酶(hydrolase)的一種(EC 3.)，催化水解葡聚糖中葡萄糖跟葡萄糖間之糖苷鍵結，屬於 O-糖苷水解酶(O-glycoside hydrolases, EC 3.2.1.-)，針對多醣體進行水解催化作用，依其作用位置而釋放出糖單體、寡糖或小分子多糖^(158,159)。根據酶分解鍵結方式區分，葡聚糖水解糖苷酶可分為 α 和 β 型式，分別水解 α -葡聚糖和 β -葡聚糖，由於組成葡聚糖的葡萄糖之間亦具有不同碳跟碳之鍵結 (如 α -1,3、 α -1,4、 β -1,3、 β -1,4、 β -1,6、 β -1,3/1,4、 β -1,3/1,6...等不同鍵結)，因而衍生出針對不同反應受質所具有的專一性蛋白質酶。根據酶作用位置來區分，葡聚糖水解酶可分為內切葡聚糖水解糖苷酶(Endo-glucanase)，隨機水解葡聚糖的任何位置，催化產物可為二、三、四糖...等大小不定之短鏈寡糖；以及從非還原端逐一水解葡聚糖最外側葡萄糖的外切葡聚糖水解糖苷酶(Exo-glucanase)，催化產物為單糖或二糖。在已知的 115 個糖苷水解酶家族中， β -1,3-葡聚糖水解糖苷酶 (endo- β -1,3-glucanase, EC 3.2.1.39；exo- β -1,3-glucanase, EC 3.2.1.58) 依據各酶之間的序列相似度與催化反應機制，主要分屬歸類在 7 個不同的家族(GH-3、GH-5、GH-16、GH-17、GH-55、GH-64 和 GH-81)

中，可水解 laminarin(長鏈不可溶性， β -1,3/1,6-葡聚糖，每 25 個糖苷分子鏈內含 1~3 個分支度)或 pachyman(短、長鏈不溶性)等之類 β -1,3-葡聚糖的 β -1,3 糖苷鍵結^(158,160)。

蛋白質胺基酸序列的相似性和其三維折疊 (fold)的相似性具有直接關係⁽¹⁶¹⁾。隨著越來越多的醣類水解酵素序列被發表，序列比較(sequence comparison)的方法也被應用在此類酵素上。由發表的文獻中可知⁽¹⁶²⁾，目前超過 2,000 種不同的醣類水解酵素，並依胺基酸相似度被分類為 115 個家族⁽¹⁶³⁻¹⁶⁵⁾ (family) (可能隨時間改變)，此訊息可由 <http://afmb.cnrs-mrs.fr/~pedro/CAZY/db.html>⁽¹⁶⁶⁾ 來提供，且超過 3,000 種以上不同醣類水解酵素的胺基酸序列被解出來了。根據酵素結構與功能的關係，我們可以預測若幾個酵素被歸類在相同的家族中，表示他們有著相同的立體催化反應結果，亦即他們的結構也可能具相同的折疊模式。到目前研究為止，對於糖苷水解酵素而言，一般認為其反應途徑大致可區分為構形保留 (retention configuration)及構形反轉 (invertin configuration)兩種方式。兩種反應途徑都含有兩個主要的 carboxylic acid residues 活性位置^(167,168)；其作用的機制可由圖 1-3 表示說明：**(A)** 保留機制(Retention mechanism)：保留性糖苷水解酵素(retaining glycoside hydrolases)進行催化作用時，利用雙取代機制導致異位性碳原子構型的保留^(169,170)，於第一步的糖基化作用 (glycosylation) 時，當作一般酸功能的羧基羧基群(carboxylic group)催化離去基團(leaving group)離開的同時，亦伴隨著第二個羧基群進行親核性的攻擊，形成糖基-酵素的過渡狀態中間體產物(glycosyl-enzyme intermediate)；在第二步的去糖基作用(deglycosylation)中，水分子被去質子化的羧基羧基群(去質子酸)活化之後，進行第二波的親核性攻擊，水解糖基-酵素之中間產物，釋放留有原受質構型之水解產物，而此反應機制也常伴隨轉糖反應(transglycosylation)，兩催化羧基間之距離約在 5.5 Å 左右。**(B)** 反轉機制 (Inversion mechanism)：反轉性糖苷水解酵素 (invertin glycoside hydrolases)利用單取代機制將 β -糖苷鍵結結構型式的糖，水解形成還原端為 α -型式的糖苷分子(或 α -鍵結轉變成 β -型式)^(171,172)。當一活化的水分子對糖分子的一號碳(C1)進行親核性攻擊時，糖苷氧基發生質子化 (protonation)的同時亦伴隨著配糖基

(aglycone)的離開，整個催化反應過程為單取代反轉機制(single-displacement inverting mechanism)，造成反構體構型的反轉，形成相反的化學立體異構物。相較於保留機制，反轉機制為利於酵素順利進行催化水解反應，讓受質和當作親核性物質的水分子都能同時進到活化部位，因此在催化活性中心的兩羧酸基團(當作一般酸催化離去基團的離開和當作一般鹼協助水分子進行親核性攻擊)間之距離可介於 6.5 ~ 10.5 Å 之間，大於保留催化機制酵素的 5.5 Å⁽¹⁷³⁻¹⁷⁵⁾。

雖然到目前 115 個家族中，只有約 70 個糖苷水解酵素家族的三維結構已被鑑定出，且它們的結構可方便地由蛋白質結構資料庫(Protein Data Bank, PDB)得知，其中由結構而引人注目的問題是歧異度(diversity)，糖苷水解酶的歧異度可由 α -helix 及 β -sheet 的組成及排列差異表現出來，此結構歧異度不僅表示了酵素催化受質的歧異度，也代表了在演化上他們彼此的差異性，此明顯差異就是酵素提供與受質不同型的穩定力量，這種力量主要貢獻在酵素反應活性中心與糖基鍵結位置上的穩定，亦即酵素穩定受質的過渡狀態複合體(包括各種引力的存在，如氫鍵為最常見到的例子)。藉由許多家族間具有結構及機制之相關性者，允許人們將它們建構在相同的群性(clan)中，並以 GH-A、GH-B、.....、GH-N (GH: glycohydrolase)等模式來分類命名，其中最大的族性為 GH-A。GH-A 中的成員都以組態保留方式催化 β -糖苷化合物，且 GH-A 的催化區域皆有 $(\beta/\alpha)_8$ 的構造，其反應之重要殘基則分別存在於 C-端之 β -sheet strand 的二級結構上。對 β -1,3-葡聚糖苷水解酵素所屬的主要六個家族研究上，相關蛋白晶體結構已有完整文獻報導⁽¹⁷⁶⁻¹⁷⁹⁾，分別包括有：蛋白晶體歸於一結構群性為 GH-A (或 $(\beta/\alpha)_8$)之家族 GH-5 與 GH-17，另一為結構群性為 GH-B (或 β -jelly roll)之家族 GH-16 及尚未鑑定結構群性之家族 GH-55 (晶體結構由整個蛋白序列鏈，形成雙 β -桶狀區域緊鄰的裂縫型(cleft/groove)之催化結構)。從這四家族之 β -1,3-葡聚糖苷水解酵素的蛋白質晶體觀之，皆呈現一近似裂縫的開口型催化結構，見圖 5-4 和圖 5-8 所示。但這四家族中唯家族 GH-55 以反轉構型機制進行酵素和受質糖的催化水解反應，其他家族 GH-5、GH-16 與 GH-17 則為保留構型之催化機制。

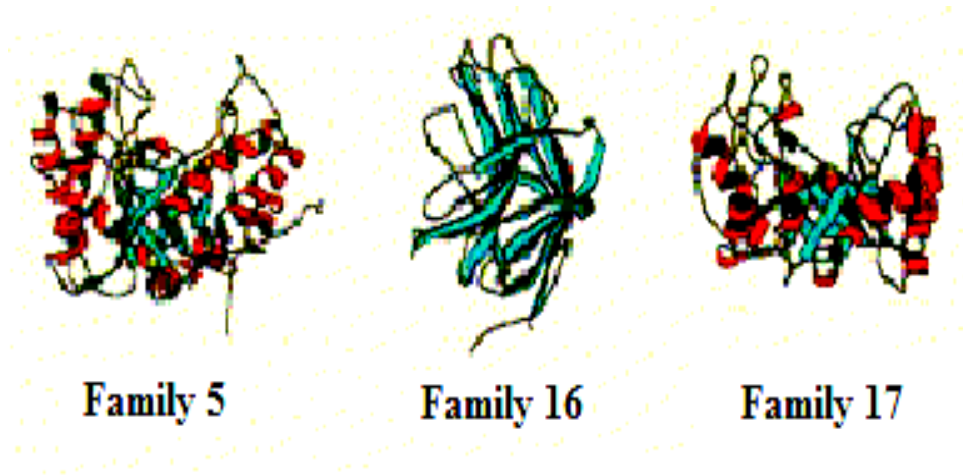


圖 5-4、家族 GH-5、16 及 17 之 β -1,3-葡聚糖水解糖苷酵素 3D 晶體結構^(170,177,178)。

根據 Gideon Davies 和 Bernard Henrissat 在 1995 年發表的文獻中指出⁽¹⁷³⁾，分別在 22 個糖苷水解酵素家族中至少有一個以上的蛋白質結構已被發表，蛋白質三級結構之折疊構型顯示出催化區域的主要折疊方式（見圖 5-5）。分析糖苷水解酵素可以發現，酵素進行催化的活化中心（active site）主要可分為三種型態，口袋型（pocket/crater）可辨認水解非還原性末端的糖分子，屬於外切型分解酵素（Exo-type）（圖 5-5_A）；裂縫型（cleft/groove）提供一開口結構，允許隨機地結合至巨分子受質之糖分子單元上進行催化作用，屬於內切型分解酵素（Endo-type）（圖 5-5_B）；隧道型（tunnel）演化自裂縫型結構，多出一段環狀物（loop）遮蓋了裂縫型結構所露出的活化中心區域，形成容許長鏈狀多醣體通過之通道，屬於外切型或內切型分解酵素則尚未定論（圖 5-5_C）。在 Gideon Davies 和 Bernard Henrissat 所發表的文獻記載僅截至 2009 年為止，糖苷水解酵素家族已增多至 115 類，且有越來越多的糖苷水解酵素結構陸續被發表，深入探索糖苷水解酵素各家族成員的結構及催化機制，陸續揭開糖苷水解酵素家族的神秘面紗。在 β -1,3-葡聚糖水解糖苷酵素中以反轉催化機制的家族研究上，至今大半仍為空白。因此，本論文著重於以研究糖苷水解酵素家族 GH-64， β -1,3-葡聚五糖生產水解糖苷酵素與受質卡德蘭膠（curdlan）反應之催化機制和蛋白質晶體結構，其有不錯成果，將於第七章節詳細探討。

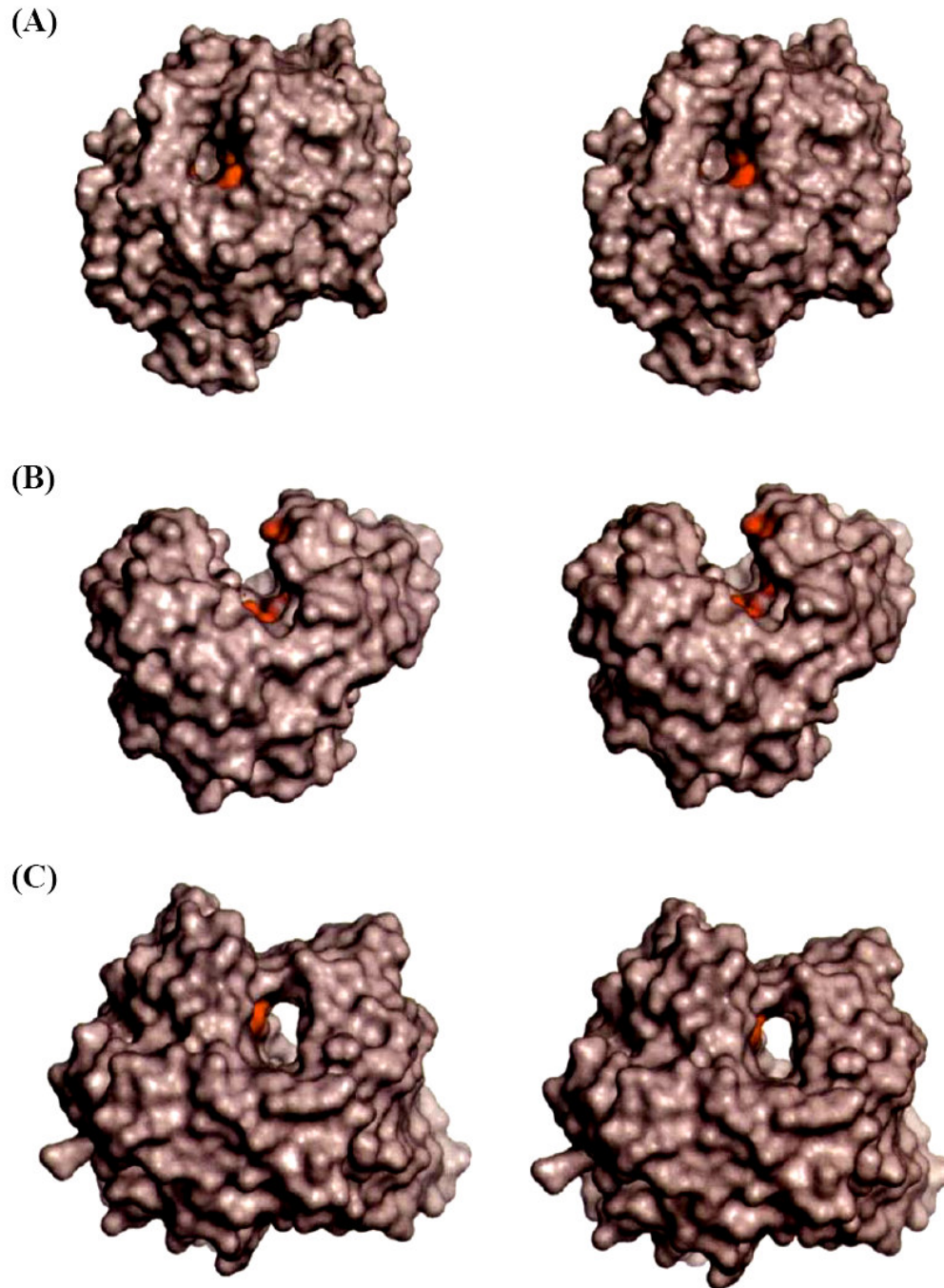


圖5-5、在醣苷水解酵素中的主要三種活化中心(active site)。

(A) 口袋型 (pocket/crater)：如*Aspergillus awamori* 菌株的glucoamylase (GH-15家族)；(B) 裂縫型 (cleft/groove)：如*Thermonospora fusca* 菌株的endo-glucanase E2 (GH-6 家族)；(C) 隧道型 (tunnel)：如*Trichoderma reesei* 菌株的cellobiohydrolase II (GH-6 家族)(紅色的部份為可能的催化殘基)⁽¹⁷³⁾。

5-5、反應受質卡德蘭膠(Curdlan)之介紹：

卡德蘭膠，又稱 Curdlan，為水不溶性的多醣聚合物，由 β -1 \rightarrow 3 鍵結的葡聚糖所組成，見圖 5-6，大多由 *Agrobacterium sp.*、*Alcaligenes faecalis* 和 *Rhizobium* 在氮源限制下時，所生成多種的胞外多醣⁽¹⁸⁰⁾，而目前已知的卡德蘭膠有 90% 的含量來源是從微生物糞產鹼桿菌 *Alcaligenes faecalis var. myxogenes* 所生產，為天然的膠狀物。是第三個為美國 FDA 所核可之微生物所發酵產的水合性膠體多醣⁽¹⁸¹⁾。

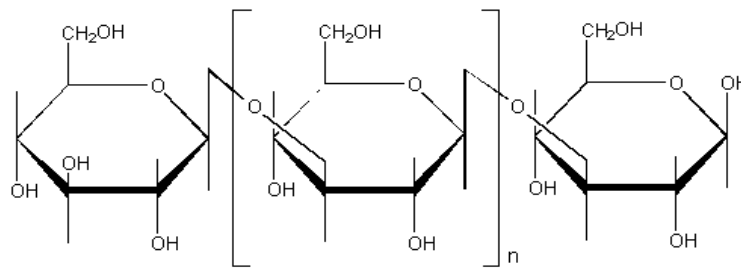


圖 5-6、卡德蘭膠(Curdlan)之化學結構。

分子量大約為 8×10^4 Da，卡德蘭膠主要在微生物生長到穩定成長狀態的時候產生，不溶於冰水中而可以溶解於熱水或是二甲基亞楓(dimethylsulphoxide)裡面。在加熱到 55°C 然後再冷卻之後卡德蘭膠可以形成一種脆弱的膠體。將加熱溫度提高到 $80\text{-}100^\circ\text{C}$ 可以提高膠體強度以形成一種堅固且有彈性的膠體，如果將之加熱到 120°C 則會將其內部分子結構轉換成三股螺旋結構。在這種高溫處理下形成的膠體就不會再因加熱而融化，並且和另外的褐藻膠(alginate gels)不一樣的是它可以不需要二價陽離子的存在而維持其結構。這種膠體的性質介於高彈性的動物膠(gelatine)和易碎的洋菜(agar)之間。在溫度不超過 140°C 之下都不會融化，並且可以抵抗大部分 β -1,3-葡聚糖苷酶的水解。另外，將溶解卡德蘭膠的鹼性溶液置於去離子水中透析也可以形成膠體。自 1983 年起，已有多種卡德蘭膠研究文獻，而其晶體構形也由水野和 A. Sarko 等人以 X-射線衍射解析出⁽¹⁸²⁾，為一與 DNA 相似的三螺旋結構，每一螺旋的糖分子間距為 5.5 \AA 而整體螺旋寬度距離為 15 \AA ，見圖 5-7。

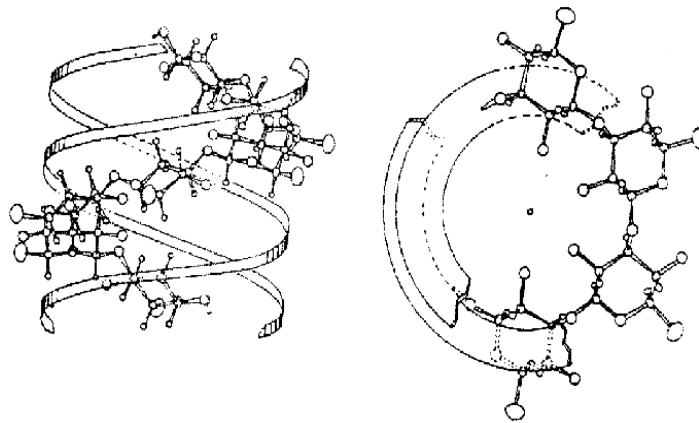


圖 5-7、以 X 射線衍射之 β -1,3-葡聚多糖晶體結構 (圖摘錄自文獻 181)

在日本，目前已經准許卡德蘭膠應用於食品之中，可用以改善一些食物的性質，例如豆腐、豆花和魚漿等。另外，食品工業上也可以用於提高食品的保水性，並且提高一些食品糕餅類的製造過程中的塑形能力。同時，卡德蘭膠也已經被研究做為固定化酶的材料單體和活性碳混合物所組成的孔洞顆粒，可以將水中的重金屬去除，因此，可以應用轉移傳統草藥上的重金屬⁽¹⁸³⁾。此外，硫化卡德蘭膠被發現有抗凝血的能力，也許具有發展醫藥產品的潛力。乙酰化卡德蘭膠(Acetyl-curdlan)的衍生物用來分離單糖和有機酸的應用也已經被申請獲得專利。此外，利用酶降解卡德蘭膠可用於獲得雙糖(laminaribiose)。

5-6、 β -1,3-葡聚糖水解糖苷酶之研究

在過去對 β -1,3-葡聚糖水解糖苷酶的研究文獻報導中，以保留機制 (retaining mechanism) 之 β -1,3-葡聚糖水解糖苷酶被研究得最為徹底，主要以集中在家族 GH-5、GH-16、GH-17 此三家族之 β -1,3-葡聚糖水解糖苷酶上，但對於另一反轉催化機制 (invertig mechanism) 包括：家族 GH-55、GH-64、GH-81 等三家族之 β -1,3-葡聚糖水解糖苷酶研究至今仍有限 (除了家族 GH-55 外，已於 2009 年從

真核菌 *Phanerochaete chrysosporium* 中，所選殖的外切型(Exo-type)之 β -1,3-葡聚糖水解糖苷酵素，以 X-ray 繞射鑑定出，蛋白晶體結構乃由整個蛋白序列鏈，所形成雙 β -桶狀緊鄰之裂縫型催化結構，並由鍵結於催化中心的長鏈 β -1,3-葡聚糖之非還原端部位，以外切型的反轉機制模式，進行酵素催化反應)。我們將過去對 β -1,3-葡聚糖水解糖苷酵素的催化機制、重要殘基和晶體結構等已知的研究歸納整理於表 5-1。在反轉催化機制，雖於其他家族的糖苷水解酵素亦被發現鑑定研究。因此，在本論文將以家族 GH-64 之 β -1,3-葡聚五糖生產水解糖苷酵素為研究，鑑定此 β -1,3-葡聚五糖生產水解糖苷酵素中何位置之胺基酸側鏈，扮演一般酸/鹼反應(general acid/base)催化殘基？

表 5-1、 β -1,3-葡聚糖水解糖苷酵素各家族之酵素催化機制、殘基與結構比較

Glycoside hydrolase family	Mechanism	Catalytic Nucleophile/Base	Catalytic Proton Donor	Clan of glycosidase family	Protein structure
GH5	Retaining	Glu	Glu	GH-A	$(\alpha/\beta)_8$
GH16	Retaining	Glu	Glu	GH-B	β -jelly roll
GH17	Retaining	Glu	Glu	GH-A	$(\alpha/\beta)_8$
GH55	Inverting	?	Glu	?	見圖 5-8
GH64	Inverting	?	?	?	?
GH81	Inverting	Glu	?	?	?

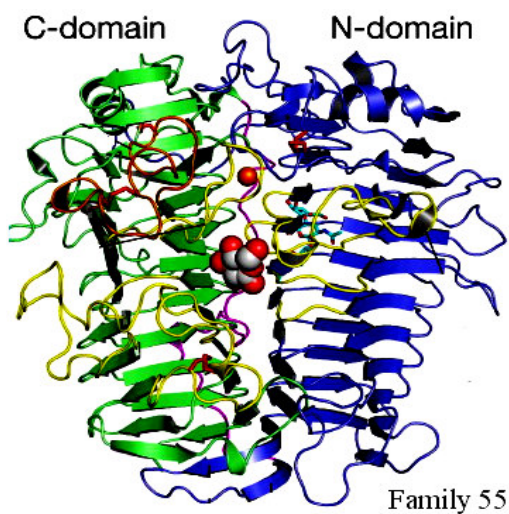


圖 5-8、家族 GH- 55 之 β -1,3-葡聚糖水解糖苷酵素 3D 晶體結構 (圖摘錄自文獻 179)。

在過去文獻中，對 β -1,3-葡聚糖水解糖苷酶家族之重要催化殘基的鑑定方法和技術上，有著不錯的研究成果，大致上以利用物理/有機化學法、酶動力學與相關光譜分析法…等，進行研究。其結果顯示藉由野生株 (wild type) 和突變株酶 (mutant enzyme) 的催化反應速率、性質的改變⁽¹⁸⁴⁻¹⁸⁸⁾，探討扮演親核性 (nucleophile) 和一般酸/鹼 (general acid/base) 催化胺基酸之位置與催化活性上的重要性⁽¹⁸⁹⁾。我們將研究之方法歸納於下列：

(1) 胺基酸序列比對：將相同家族的糖苷水解酶基因群，作胺基酸序列比對後，選出高度保留之胺基酸點及可能的催化殘基胺基酸 Asp、Glu 位置，以定點突變的方式產生此位置突變株酶，針對此位置突變株的催化活性跟野生株相比，活性皆至少降低 1,000 倍以上，或以詳細的 pre-steady-state 和 steady-state 的動力學 k_{cat} 、 K_m 分析⁽¹⁸⁷⁾。由此推測，可能為重要催化殘基胺基酸。

(2) 活性位置 (active site) 之滴定⁽⁷⁵⁾：使用活性位置不可逆抑制劑標的和二次質譜的定位作用 (active site affinity labelling and tandem mass spectrometric localization)：此方法為最直接證明活性中心親核性胺基酸及一般酸鹼催化胺基酸之殘基所在。此法是由輻射線標地的失活劑加以改良而來的，此原理是先從反應機制上找一個專一性高的不可逆抑制劑 (失活劑)。一般而言，糖類水解酶的失活劑種類很多，可依照相同水解家族 (group-specific labels)、反應機制 (mechanism-based inhibitors) 及過渡狀態複合體類似物 (transitional complex analogue) 來區分，通常失活劑可為受質的修飾物或衍生物，而糖類水解酶的受質又可在糖基鍵結 (glycone moiety) 及非糖基鍵結 (aglycone moiety) 兩個部位上做修飾物或衍生。

不管於何部位做修飾或衍生，失活劑的尋找要件為下述兩點：(1) 此失活劑要能與目標酶具有專一特異性，即此失活劑僅跟活性中心的親核性胺基酸作用，而不與活性中心以外的胺基酸作用。(2) 作用後必須能與目標酶結合成一穩定的共價

鍵結物，而不被快速水解。利用抑制劑鍵結型態(inhibitor binding)之酵素動力學分析實驗，求得抑制速率常數(k_i)、抑制常數(K_i)及復活速率常數($k_{react.}$)⁽⁷⁶⁾，將這些數值與野生株酵素作比較、或以質譜儀或¹H-NMR 光譜儀…等分析所反應後的共價鍵結物。

於找到適合失活劑之後，將適量的失活劑與酵素反應一段時間，待酵素行完全的失活反應，此反應液即為標示化的酵素，將此反應液以蛋白質水解酵素如 papain、pepsin 等行消化水解反應(enzymatic digestion)後，可得到一群胜肽的混合物，將此混合物及未標示的胜肽(對照組)流經逆向式液相管柱層析儀(RP-HPLC)，得兩張層析圖，將此兩張圖做胜肽圖譜(peptide mapping)比對後，就可把已有標示的胜肽純化及鑑定出來。鑑定出來有標示的胜肽，仍可做胜肽定序鑑定或再以電子噴灑離子化串聯質譜儀(ESI-MS/MS)^(77,190)，以確定標示物是與酵素活性位置中的親核性胺基酸做共價鍵結，其流程見圖 1-9 所示。此方法的優點為快速、靈敏、不需使用含輻射標地物，而其功能又能達到如含輻射標地物的使用要求。

(3) 典型動力學分析：熱穩定分析(thermal stability)⁽⁷⁸⁾、酸鹼度對活性的分析(pH dependence)、結構與活性的研究(structure/reactivity studies)及二級同位素效應分析(secondary deuterium kinetic isotope effects)⁽¹⁹¹⁾來判斷野生株與重要殘基之突變株的反應機制差異。

(a) 由圓二色性光譜儀對蛋白質熱穩定分析，在一電場矢量方向按順時針方向旋轉的，稱為右圓偏振光；電場矢量方向按逆時針方向旋轉的，稱為左圓偏振光。而圓二色性(circular dichroism, CD)光學活性分子對左、右圓偏振光的吸收也不同，使左、右圓偏振光透過後變成橢圓偏振光，這種現象稱為圓二色性，而以 L-型式胺基酸所組成之蛋白質，在結構大致有三種： α -helix、 β -sheet、unordered，此三結構於 CD 光譜下，在 190~250 nm 吸收下有不同之 θ 值(見圖 1-10 所示)，藉此判定野生株、突變株酵素之蛋白質結構對催化活性的改變影響。

(b) 酸鹼度對活性的分析 (由 $\log k_{\text{cat}}$ 與 pH 作圖): 在醣苷水解酵素(Glycoside hydrolase)上, pH-profile 呈現對稱鐘型曲線(bell-shaped curve)的趨勢, 表酵素活性由兩個 pKa (apparent pKa) 操控, 分別代表扮演一般鹼催化(親核性)基團與一般酸催化基團。在許多酵素的研究中, 利用野生株與突變株酵素兩者在解離常數(pKa)的改變, 因催化殘基基團突變過後造成親核性基團與一般酸催化的酸基團距離更遠了約 1Å (兩者的吸引力變弱), 這使得酵素與受質的複合體之幾合形狀改變了, 而造成操控的 pKa₁ 或 pKa₂ 值下降改變。此兩個 pKa 反應顯示出兩個胺基酸殘基在催化過程中扮演重要角色。

(c) 結構與活性二級同位素效應的研究: 從蛋白質-受質糖的複合蛋白質晶體結構, 判斷重要催化殘基胺基酸之位置。由二級同位素效應 (secondary deuterium kinetic isotope effect) 研究可知酵素催化反應之可能的過渡狀態體結構。利用突變株之 Brønsted plot ($\log k_{\text{cat}}$ 對離去基離去的難易度作圖) 與野生株酵素對各不同離去基之受質的催化, 其 k_{cat} 、 K_m 值比野生株酵素降低 $10^3 \sim 10^4$ 倍, 鑑定出可能為催化殘基的突變株酵素。

(d) 藉由化學活性復活法⁽⁷⁹⁾, 以增加酵素水解速率(Hydrosylation step), 可加入具親核性的陰離子或功能性酸根離子試劑, 如: 疊氮(azide)、甲酸根(formate)…等, 作為競爭型親核劑, 可增加催化殘基突變株酵素之催化 k_{cat} 值約 20~200 倍。當以疊氮取代作為親核性攻擊時, 糖苷受質與酵素反應的產物, 經由 ¹H-NMR 鑑定之, 可瞭解其疊氮所扮演為酵素親核性基團的胺基酸突變, 或為一般酸/鹼催化的胺基酸突變。

而在本論文的研究中, 鑑定醣苷水解酵素家族 GH-64 反轉催化機制之 β -1,3-葡聚五糖生產水解糖苷酵素, 何者胺基酸側鏈扮演一般酸 / 鹼催化反應 (general acid/base) 之重要殘基? 也大致採取以上敘述之相關方法與技術, 其結果將於後續章節討論。

5-7、人造基因技術簡介

於蛋白質工程應用(protein engineering applications)中，已有許多合成人造基因例子。1981年由 Edge 使用固相合成法⁽¹⁹²⁾(見圖 5-9)，合成大小約為 20~40 鹼基對不等單股寡去氧核糖核苷酸模板，並使其 5'端磷酸化，藉由模板中小片段彼此重疊互補，於高溫反應然後冷卻降溫結合使 DNA 互補黏合成雙股，再以 T4 接合酶將其接合，以完成基因的全合成，但合成基因長度有限且易造成接合時的突變。在 1992 年由 Prodromou 發展一利用聚合酶連鎖反應來進行基因合成⁽¹⁹³⁾(見圖 5-10)，稱作 Recursive PCR，首先合成 3'端互相重疊互補的寡核苷酸模板片段，一起進行 PCR 反應(assembly PCR)，藉 PCR 反應延伸放大接合成較長的雙股 DNA 產物。於 2000 年 Eileen 改善 Recursive PCR，其基本原理同 Recursive PCR，但此法引進小片段的引子，首先將兩兩互補的寡核苷酸模板，加入各作用之引子，進行 PCR 接合延伸，作進一步產物膠回收純化，後將產物再進行相同步驟 PCR 反應，即可合成全長基因(見圖 5-11)。

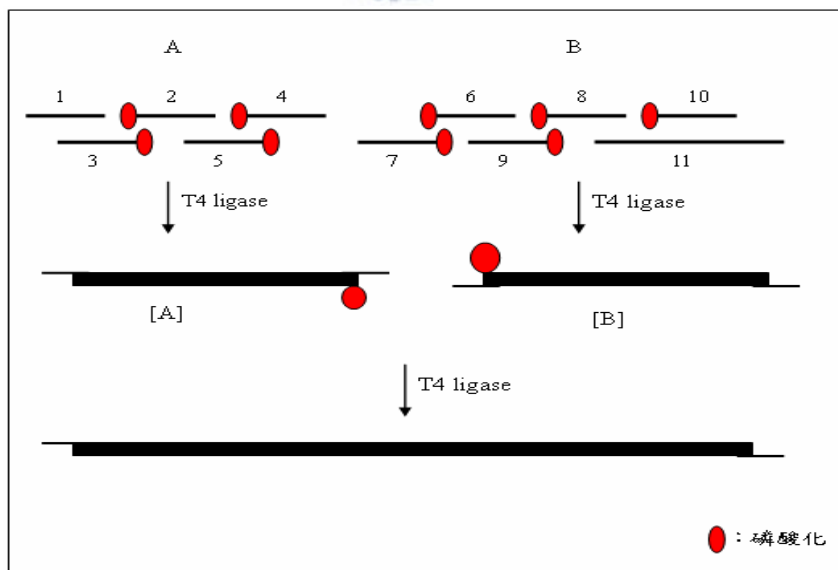


圖 5-9、Edge 之人造基因設計概念。

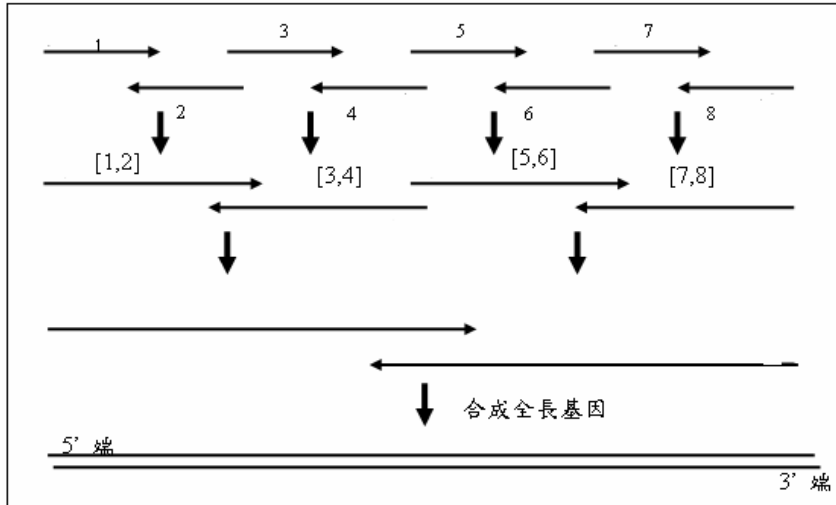


圖 5-10、Prodromou 發展之 Recursive PCR 於基因合成。

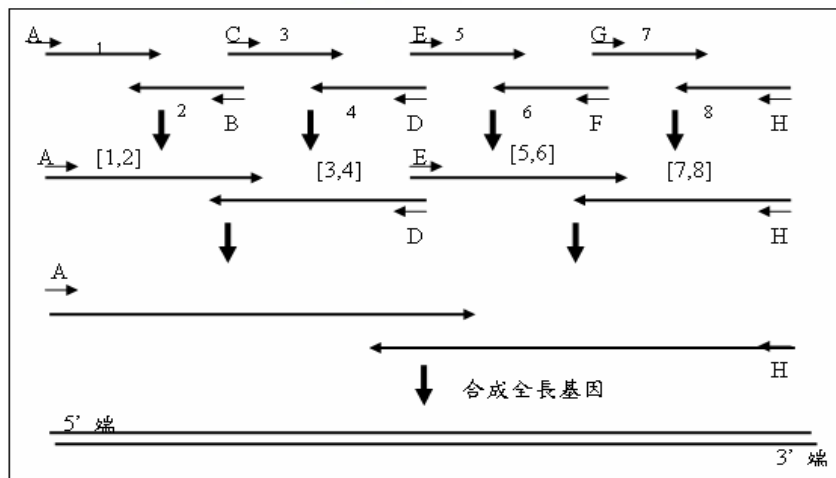


圖 5-11、Eileen 改良後之 Recursive PCR 概念示意圖。

合成的人造基因利於基因選殖的優點：

- (1) 依所需的表現系統(如大腸桿菌、酵母菌)，設計合於該系統所使用頻率高的密碼子(codon)，確保蛋白質的表現。
- (2) 在基因的全長序列中，可精確設計限制酶的種類與位置，方便選殖的進行。
- (3) 在真核生物的基因中，含有插入序列和表現序列，以設計合成人造基因，可省去繁雜的選殖(如由 cDNA 建構基因)工作。

本實驗利用聚合酶連鎖反應合成人造基因的設計概念⁽¹⁹⁴⁾，於此簡述設計的方法，利用設計每股模板，同時，也作為另一股模板的引子，以基因序列的中間向兩端設計，將基因分成 12 組，每組基因設計成兩寡核苷酸模板，一為正股、另一為反股。如圖 5-12，中間兩長虛線為目標基因序列，24 個箭頭即為設計的寡核苷酸模板，每段相鄰的寡核苷酸模板約有 12 至 14 個鹼基相互重疊(基因互補)作為引子，於 PCR 反應下，兩段寡核苷酸模板重疊處黏合一起，利用聚合酶從 5'端往 3'端延伸，而將所需 β -1,3-葡聚糖生產水解糖苷酵素完整人造基因合成出來。

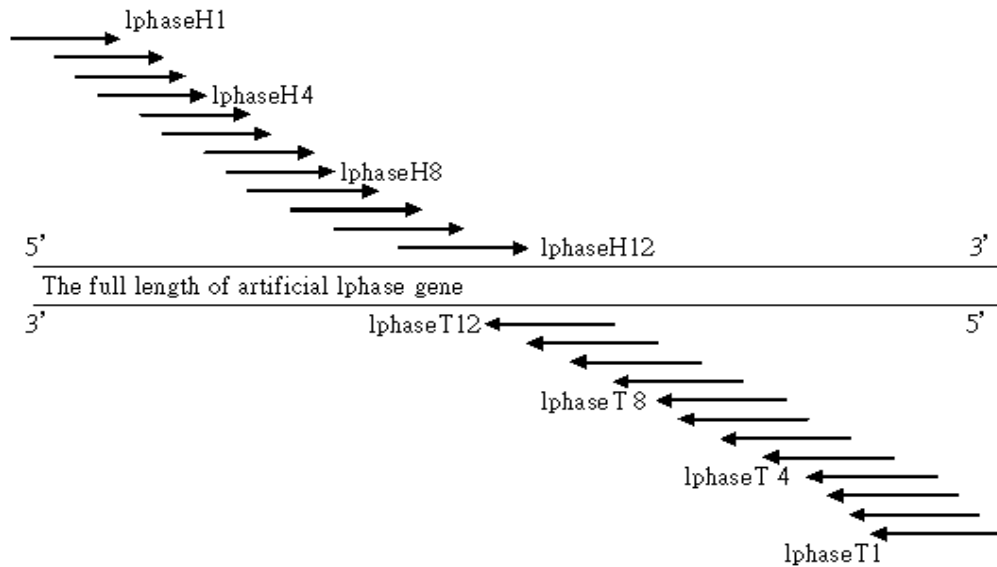
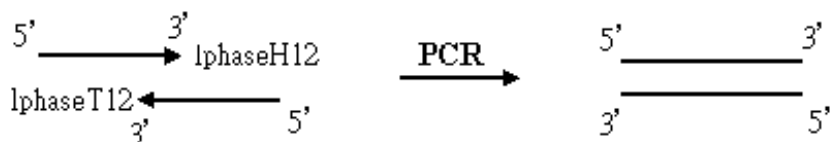


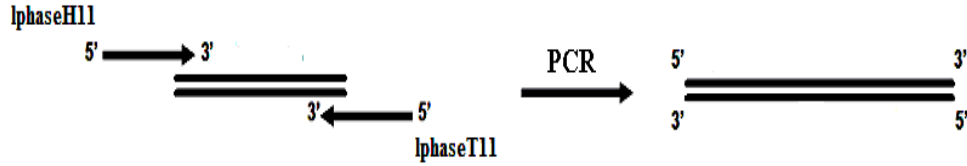
圖 5-12、本實驗人造基因之設計原理。

利用下列步驟合成 β -1,3-葡聚糖生產水解糖苷酵素(LPHase)全長基因：

1. 先由 lphaseH12 和 lphaseT12 進行 PCR 放大，兩段寡核苷酸模板在基因序列互補處黏合，利用聚合酶從 5'端往 3'端延伸，複製成兩端一樣長。



2. 將 1.產物作為第二組(即 lphaseH11 和 lphaseT11)的寡核苷酸模板引子進行 PCR 放大，lphaseH11 和 lphaseT11 與 1.產物的順股和逆股在重疊基因互補處黏合，同樣利用聚合酶從 5'端往 3'端延伸，複製成兩端一樣長。



3. 重複步驟 2.到第十二組(即 lphaseH1 和 lphaseT1)，將整段 LPHase 的人造基因完成。

5-8、*Streptomyces matensis* 菌株與 β -1,3-葡聚五糖生產水解糖苷

酵素(LPHase)之簡介

Streptomyces matensis 為鏈黴菌(*Streptomyces* spp.)的一種，其因呈現鏈狀排列而得名，屬於好氧菌(aerobic bacterium)，且為放線菌(*Actinomycetes* spp.)中最大的族群，屬於原核微生物(prokaryotic microorganism)中之革蘭氏陽性細菌(Gram-positive bacterium)。多數鏈黴菌具有分泌細胞外酵素和抗生素物質的能力，可分泌多種分解蛋白質、幾丁質(chitin)、纖維素(cellulose)和木質素(lignin)等酵素，分解自然界中不易分解的物質，某些種亦可產生結構複雜的抗生素物質，如放線菌素(actinomycin)、鏈黴素(streptomycin)、氯黴素(chloramphenicol)和四環黴素(tetracycline)等，能廣泛且有效地抑制植物病原菌，為保護植物的重要菌源。鏈黴菌廣泛地存在土壤、淡水和海水等環境中，截至目前為止已發現100個屬左右的菌株，鏈黴菌及其相關的屬已有超過1000個以上的種和變種⁽¹⁹⁵⁾。

分泌自鏈黴菌 DIC-108 (*Streptomyces matensis* DIC-108)的蛋白質 β -1,3-葡聚五糖生產水解糖苷酵素又名為 Laminaripentaose-producing β -1,3-glucanase (LPHase)，歸屬於糖苷水解酵素第 64 家族⁽¹⁹⁶⁾ (family GH-64)的成員(EC 3.2.1.39)，對直鏈之

β -1,3-葡聚多糖進行催化水解反應，為一內切型葡聚糖水解酵素(Endo-glucanase)，作用在長鏈型生物巨分子(如:curdlan)的 β -1,3 糖苷鍵結，以高度專一性地分解 β -1,3-葡聚多糖，並產生五個葡萄糖所組成的 laminaripentasaccharide 寡聚物(oligomer)；其催化的反應機制也已發表於文獻中，藉由 $^1\text{H-NMR}$ 圖譜觀測，得知酵素與受質隨時間反應的立體選擇性變化(見附錄 IX)，屬於反轉構型機制之 β -1,3-葡聚糖水解糖苷酵素(inverting β -1,3-glucanase)^(158,196)，見圖 5-13 所示之催化機制示意圖。*Streptomyces matensis* DIC-108 的 LPHase 基因(GenBank: AB019428)及 LPHase 蛋白質(GenePept: BAA34349)已發表在 NCBI 網站(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)，基因的解碼序列(coding sequence, CDS)有 1,206 個鹼基對(base pair)，可以轉錄轉譯出 401 個胺基酸，整段蛋白質序列前面有一小段具有 35 個胺基酸 (MLRTLRRRVTAVALGLATALGGGWLAAGVPSPAHA)的訊號胜肽(signal peptide)，除訊號胜肽外之蛋白質分子量約為 40 kDa。LPHase 成熟蛋白(mature protein)之胺基酸序列與同家族的 *Oerskovia xanthineolytica* (GenBank: AAA25520)和 *Arthrobacter* sp.YCWD3 (GenBank: AAN04892)兩菌株中，以分泌生產製造型態的 β -1,3-葡聚糖水解糖苷酵素，其蛋白催化反應區域(catalytic domain)的胺基酸序列具高達 65%相似度(完整序列比較參考附錄 X)；而這兩菌株以生產具有裂解真、黴菌細胞壁作用之酵素群⁽¹⁹⁸⁾，其中亦包括 β -1,3-葡聚糖水解糖苷酵素，但對水解 β -1,3-葡聚糖之專一性較低，產物為各長度不等的 β -1,3-葡聚寡糖(laminari-oligosaccharides)。在這三菌株之 β -1,3-葡聚糖水解糖苷酵素序列比對中，更發現 LPHase 酵素缺少了位於 C 端似植物凝血素區域(lectin-like domain)的 150 個胺基酸胜肽鏈，此胜肽鏈之性質為生物 I-型凝血素區域(I-type lectin domain)，歸屬糖苷鍵結蛋白質家族 13 (Carbohydrate binding protein-family 13)，是與不溶受質糖有鍵結結合作用的重要結構蛋白^(197,198)。因此，LPHase 結合至受質的區域仍有待商確，得利用 X-光晶體繞射(X-ray diffraction)的方式來取得 LPHase 的三級結構，藉由蛋白質 3D(three-dimensional)立體結構來判斷蛋白質與受質反應的確切位置。

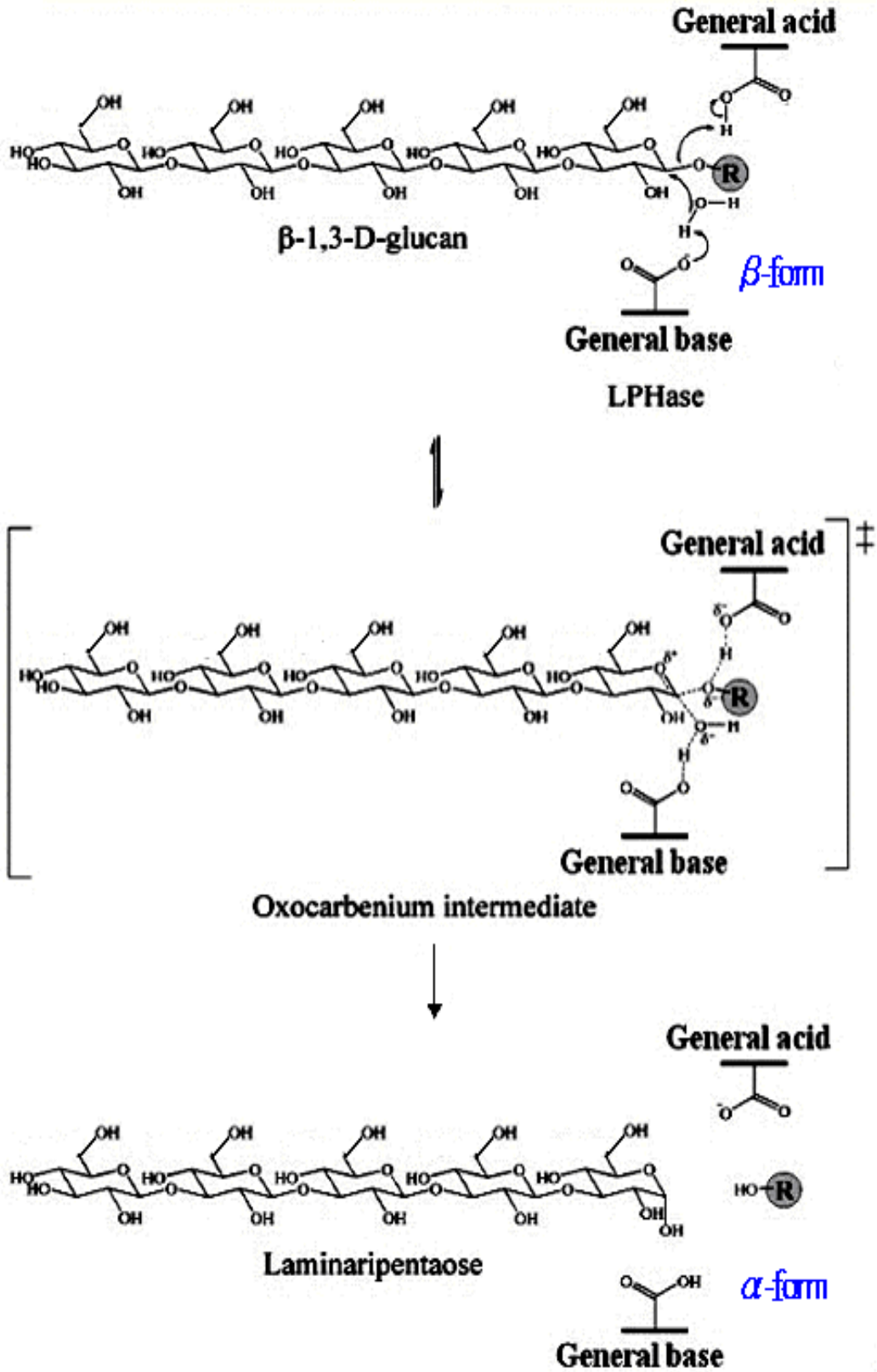


圖 5-13、 β -1,3-葡聚五糖生產水解醣苷酵素之催化反應機制示意圖。

5-9、本論文的研究動機

酵素可謂是一有機體反應作用中催化劑的扮演者，降低反應活化能，增加了對反應的速率與專一性。在酵素學的研究上，對糖苷水解酵素的催化反應機制與重要催化殘基基團的鑑定更是一重要的研究課題。針對糖苷酵素家族 GH-64 的眾多 β -1,3-葡聚糖水解糖苷酵素之中，我們以源自日本研究學者所選殖 *S. matensis* DIC-108 菌種之 β -1,3-葡聚五糖生產水解糖苷酵素 (LPHase) 為研究對象。首先，將以人造基因方式利用 PCR 技術重建此酵素基因，並深入研究、探討酵素的催化性質。本論文的研究動機也將分成以下幾點：(1) 建構完整人造重組酵素 LPHase 之表現與純化系統，針對該酵素催化性質與反應機制進行研究，(2) 建構一如何製備大量 β -1,3-葡聚五糖的生產流程，(3) 鑑定出 LPHase 在催化反應中，所扮演一般酸/鹼催化 (general acid/base) 之胺基酸，(4) 鑑定出 LPHase 酵素之蛋白晶體結構，和探討與糖苷受質的鍵結模式、水解作用之關係。以上結果將詳述於第七章節-結果與討論中。

第六章 實驗方法

6-1、藥品器材與儀器

1. 藥品：

菌種培養液藥品(Tryptone、yeast extract)購自 Merck、Difco 公司。

活性測試及緩衝溶液配製藥品購自 Merck、Aldrich、TCI、Sigma。

各式 Kit (T_A cloning Kit、PCR extract、Gel extract、Plasmid extract Kit、T4 ligase Kit)

購自 GeneMark、Viogene、NEB。

2. 儀器：

恆溫培養箱 (EYELA NDO-450ND)

搖動培養箱 (RISEN refrigerated circulators、

FIRSTEK SCIENTIFIC B602D, S300R, S302R)

UV 吸收光譜儀 (Agilent 8453)

高速離心機 (KUBOTA 7700)

電子噴灑式串聯質譜儀 ESI-Q-TOF (Micromass)

真空濃縮機 EYELA rotary vacuum evaporator N-N series

超音波震盪儀 Misonix, ultrasonic processor

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

PC808 Program temp control system)

3. FPLC system (Pharmacia Biotech FPLC3467)

層析管柱：HiTrap Desalting column (Pharmacia, 5 mL)

HiTrap SP column (Pharmacia)

HiTrap Q column (Pharmacia)

CM Sepharose™ Fast Flow column (Pharmacia)

分液收集器 (ISCO、Pharmacia Biotech FRAC-100)


4.自製藥品：

膠狀卡德蘭膠：

取 3 公克的卡德蘭膠粉末(curdlan, WaKo, Japan)加入 150 ml 的 20 %酒精溶液，攪拌 20 分鐘後，離心。將卡德蘭膠沉澱物慢慢加入 100 mM 磷酸/氫氧化鈉緩衝溶液(pH 10.5)約 150 毫升，在室溫下攪拌約 20 分鐘後，以鹽酸中和並離心。將沉澱的白色卡德蘭膠狀物，在溫度約 70~75 °C 下，均勻攪拌 2 小時後，離心，然後以去離子水多次清洗白色膠狀物以去除鹽類。最後，以 50 mM 磷酸緩衝溶液(pH 7.5)調整至約 2 %(w/v)的膠狀卡德蘭膠懸浮液，於 4 °C 下保存。

6-2、 β -1,3-葡聚糖生產水解糖苷酵素人造基因之建構

6-2-1、整段人造基因之設計



列出 β -1,3-葡聚糖生產水解糖苷酵素，從起始密碼子(start codon, ATG)到終止密碼子(stop codon, TGA)，完整的基因序列。將原本的序列密碼子，修改成大腸桿菌製造胺基酸，使用頻率較高的密碼子。

於 5'端核苷酸模板引子設計含有 Pst I 和 Nde I 的限制酶水解位置，而 3'端核苷酸模板引子設計含有 EcoR I 和 Hind III 的限制酶水解位置。隨後依照該蛋白質基因序列，於設計人造寡核苷酸模板時，利用 primer 5 軟體修改密碼子，使每一段在 PCR 夾出的產率達到最高。

6-2-2、寡核苷酸模板(oligonucleotide template)之設計

設計想法如**章節 5-7**中所述，每段相鄰的寡核苷酸模板設計約有 11 至 13 個鹼基相互重疊，當作為引子，所以合成下列 24 段寡核苷酸模板：

LPHaseH1 : *NdeI*
 -5'GCTGCAGGTCATATGGCGGTCCCTGCCACG 3'-

LPHaseH2 :
 -5'GTCCCTGCCACGATTCCGCTGACCATCACGAACAACCTCGGGT
 CGCGCAGAGCAGATCCATATC 3'-

LPHaseH3 :
 -5'GCAGATCCATATCTACAACCTGGGGACCGAGCTCTCGTCTGG
 TCGCCAAGGATGGGCTGACGCCAGTGGG 3'-

LPHaseH4
 -5'GACGCCAGTGGGGGCATTCCATCCGTGGCCAGCAGGTGGGAA
 TCCTCCTACTCCAGCTCCA 3'-

LPHaseH5
 -5'ACTCCAGCTCCAGATGCCTCCATCCCTGGTCCTGCTCCGGGT
 CGCTCCACCACGATCCAA 3'-

LPHaseH6
 -5'CCACGACCATCCAAATCCCCAAGTTCTCTGGCCGCATCTACT
 TCTCGTACGGGCGCAAGATGGAGTTC 3'-

LPHaseH7
 -5'CAAGATGGAGTTCCGACTGACTACCGGTGGCCTCGTGCAGC
 CCGCCGTACAGAACCCG 3'-

LPHaseH8
 -5'GTACAGAACCCGACTGACCCGAACCGCGACATCCTCTTCAA
 CTGGTCCGAGTAC 3'-

LPHaseH9
 -5'TGGTCCGAGTACACGCTCAACGATTCCGGGCTCTGGATCAA
 CAGTACGCAGGTCGAT 3'-

LPHaseH10
 -5'ACGCAGGTCGATATGTTCTCAGCTCCCTACACGGTGGGTGT
 GCGCCGCGGTGACGGGACTACACTGAGT 3'-

LPHaseH11
 -5'GACTACACTGAGTACTGGTAAACTTCGCCCTGGCGGGTACA
 ACGGTGTGTTCAATGCC 3'-

LPHaseH12
 -5'GTGTTCAATGCGCTCAGAGGACAGTCTGGCGGATGGGCTAA
 CCTCATTACAGACGCGATCC 3'-

LPHaseT1 *EcoRI*
 -5'AAGCTTGAATTCAGTCGAACGGGTCGAGCGTCAGAGA 3'-

LPHaseT2

-5'GAGCGTCAGAGAGAGGCACCGCGAGGGTCACCGTCATGTACCAGAG
ACTCGTGATGTCCCAC 3'-

LPHaseT3

-5'GTGATGTCCCACGTCGTCGAATGCGAAGCCGTACGCCTTACCGTC
CGCCATGTGTGCATGTATGAT 3'-

LPHaseT4

-5'GTGTGCATGTATGATCCGCGCGTAGTGATTTCGTGACCGGCTCCTG
GTAGAATCCCGCTGC 3'-

LPHaseT5

-5'GAATCCGGCTGCGCTACGGTCAGGCTGATGTGGGTTGGCGAGCA
GGGTGGTACGGTT 3'-

LPHaseT6

-5'GGTGCTACEGTTGAAGCCCGCACAGACCGTACGAGAGATGGGTC
CGCGTACTGGTCATTCGG 3'-

LPHaseT7

-5'CTGGTCATTCGGGGCGTCGAGGAGGCGGTGGCACCCAAATACTG
AGGAGGCATCTGGCTTCTG 3'-

LPHaseT8

-5'GGCATCTGGCTTCTGGAATGTAGTGACGACTGCACCGGACCCAT
CAGTGAACCGCAGGACACC 3'-

LPHaseT9

-5'CCGCAGGACACCTCCAGAGACGCGACCAGTGTAGCGCACGTCA
GGACGATCGGCGAAGGG 3'-

LPHaseT10

-5'ATCGGCGAAGGGGGTGACTATGAGATCGGTACCTGTGTACTTGT
TCCAGACACGGTTGATGTA 3'-

LPHaseT11

-5'GACACGGTTGATGTAGTCGTCATGACTGAGGCCGGGAGGGCA
CCTGTCTCGACACCATAGAG 3'-

LPHaseT12

-5'GACACCATAGAGTGGAGAGAGCGCTCGAAGCACGGTACCAT
CGGATCGCGTCTGAAT 3'-

寡核苷酸模板序列命名如上述，而標上粗黑線代表與相鄰序列彼此重疊的地方，即作為模板引子。編號 LPHaseH1 到 LPHaseH12 的寡核苷酸模板是順股(sense)設計，而編號 LPHaseT1 到 LPHaseT12 的寡核苷酸模板是反股(anti-sense)設計。因此，序列間反應會與前面列出的模板基因序列重疊互補。

6-2-3、基因的放大

將設計的寡核苷酸模板，照著合成原理中所設計的順序進行 PCR：

6. 第一次 PCR，由模板引子 LPHaseH12 和 LPHaseT12 開始，此兩段模板含有彼此互補的引子，將所有下列比例藥品，加入 250 μl 微量離心管：

(4) 10X reaction buffer：5 μl

(5) 寡核苷酸引子 LPHaseH12 (125 ng/ μl)：2 μl


寡核苷酸引子 LPHaseT12 (125 ng/ μl)：2 μl

(3) 10 mM 的 dNTP mix：1 μl

(4) 加入 ddH₂O 使最後體積：50 μl

(5) 加入 1 μl 之 *vent* DNA 聚合酵素(2.5 U/ μl)。

7. 進行梯度 PCR 反應



區間	次數	溫度	時間
1	1	95 °C	2 min
2	20	95 °C	30 sec
		53~63 °C	30 sec
		69 °C	1 min/kb (<i>vent</i>)
3	1	69 °C	1 min
	1	4 °C	30 min

3. PCR 完成後，取 2 μl 進行 DNA 電泳分析，以確定產物的大小，之後利用 PCR 純化管柱，進行純化與回收。

4. 往後所進行梯度 PCR 時，都以前一次的回收產物作為模板，再加入寡核苷酸模板引子進行增長，依下列反應條件比例，逐次增長基因長度。

濃度	試劑	體積
70 ng/μl	前次純化之 PCR 產物	3μl
10 pmol/μl	primer(正股)	1μl
10 pmol/μl	primer(逆股)	1μl
10 mM	dNTP	1μl
10x	reaction buffer	5μl
2.5 U/μl	<i>vent</i> polymerase	1μl
	ddH ₂ O	38μl

*** 分別取適量 PCR 產物進行 DNA 電泳分析**

5. 完成 12 次 PCR 後，將最終產物進行 DNA 電泳分離，然後利用 DNA 膠回收純化管柱，進行回收約 1,200bp 片段，而得到完整人造 β-1,3-葡聚五糖生產水解糖苷酵素(LPHase)基因。



6-2-4、β-1,3-葡聚五糖生產水解糖苷酵素之人造基因選殖

1. 將上述純化的完整人造 β-1,3-葡聚五糖生產水解糖苷酵素基因，利用 *Taq* 聚合酶在 3' 端加上去氧核糖核酸腺嘌呤(dATP)。

濃度	試劑	體積
50 ng/μl	純化的人造基因	15μl
10 mM	dATP	1μl
10 x	reaction buffer	2μl
2.5 U/μl	<i>Taq</i> polymerase	1μl
	ddH ₂ O	1μl

* 將上述藥品混合均勻，置於 69 °C 下 90 分鐘。

2. 把步驟 1.反應後的混合產物，利用 PCR 膠回收純化管柱進行回收，所得修飾 DNA 溶液置於 4 °C 冰上，然後依下列藥品比例混合均勻，置於 16 °C 下，反應 24 小時即完成。

試劑	體積
修飾之 DNA 溶液	13 μ l
Reaction buffer A	1 μ l
Reaction buffer B	1 μ l
益生 T_A 選殖載體	4 μ l
T4 DNA ligase	1 μ l

* 完整 T_A 選殖載體 DNA 見附錄 XI_A。

3. 將接合好的質體，轉型進大腸桿菌 JM-109 培養，其方法與步驟同章節 6-4 所描述。
4. 進行 DNA 電泳分析，以確定基因片段與載體接合，並定序確定每一鹼基的完整正確，以進行後續實驗(將此質體 DNA 命名為 T_A-*lphase*)。

6-3、勝任細胞(competent cell)的製備

製備的方法與步驟，同章節 2-3 所描述之內容。

6-4、轉型勝任細胞(transformation)

取出 competent cell，冰浴下溶解。將 10 μ l 以純化管柱處理過的質體 DNA，加入 20 μ l 5X KCM 溶液和 50 μ l 無菌水混勻後，以 heat shock 方式加入 100 μ l 大腸

桿菌 JM-109 competent cell 中混勻，冰浴 20 分鐘，置於 42 °C 下 60 秒，後放置室溫 20 分鐘，加入 50 µl LB，置於 37 °C 以 200 rpm 培養 1 小時。將 100 µl 分別各取 50 µl 菌液塗在培養皿上(LB-Amp)，置於 37 °C 培養 20 小時。

最後，由 LB-Amp 洋菜基培養皿上點選單菌落，用 LB-Amp 培養液以 37 °C、150 rpm 培養 16 小時。取 3~5 ml 菌液，利用質體抽取管柱純化出乾淨的質體作為定序(cycle sequencing)的模版。此模板最後溶於 40 µl 無菌水之中。

6-5、基因定序(sequencing)

取少量含有T_A-*lphase*質體(plasmid)的大腸桿菌JM-109菌株，將其塗在含有抗生素(Ampicillin，100 µg/ml)的細菌培養基 (Agar plate)上，利用T_A載體上的抗Ampicillin基因，於培養盤上長出單一菌落(single colony)，接著進行基因定序(委請明欣生物科技有限公司 DNA定序)，分別定出正向(Forward)和反向(Reverse)的基因序列，並將取得的基因定序結果進行序列比對，確保基因序列與LPHase之人造基因(artific_gene_lphase)比對正確無誤之後，接續進行後續的實驗。

6-6、 β -1,3-葡聚五糖生產水解糖苷酵素的人造基因重組與定點突變

6-6-1、 β -1,3-五糖生產水解糖苷酵素基因與表現載體 pRSET_A 的接合(ligation)

6. pRSET_A 載體(完整質體見附錄 XI_B)(環狀)，以 Nde I 和 EcoR I 限制酶水解成兩段線性 DNA，並使用 DNA 膠回收純化管柱，回收純化約 2,900bp 片段。
7. 將含有人造基因 LPHase 之 T_A 選殖質體，也以 Nde I 和 EcoR I 限制酶水解成兩段線性 DNA，並使用 DNA 膠回收純化管柱，回收純化約 1,200bp 之 LPHase 人造基因片段。
8. 將步驟 1.和 2.所得之載體和人造基因片段以 1:5 比例混合，加入 1 μ l 的 T4 DNA 接合酶(ligase)與 1 μ l 的接合酶反應液(ligase buffer)，最後以 ddH₂O 加至總體積為 10 μ l，置於 16 °C 水浴中 24 小時進行接合反應。
9. 將剪接好的質體，轉型進入大腸桿菌 JM-109 培養其步驟與章節 6-4 相同。
10. 以 Nde I 和 EcoR I 限制酶水解質體 DNA，並進行 DNA 電泳分析，以確定基因片段與載體接合，並定序且挑選正確接合方向的質體 DNA，以進行後續實驗(將此質體 DNA 命名為 pRSET_A-lphase)。

6-6-2、定點突變(site-directed mutagenesis)

本研究所使用之定點突變方法為 Strategen 公司所開發之 Quick Change 法，簡略圖如下：

設計原理：

步驟 1
質體製備

質體內目標基因
突變位置(●)

步驟 2
溫度循環

使質體失活後黏上有設計突變點的寡核苷酸引子

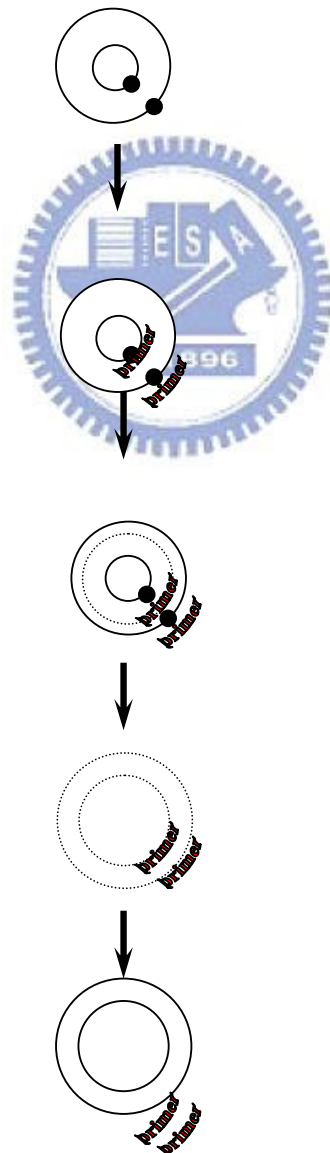
利用 pfu 聚合酵素延突變點寡核苷酸引子產生具缺口的圓形股

步驟 3
分解

利用 *Dpn* I 分解甲基股 DNA

步驟 4
轉型

將圓形有缺口的 DNA 轉型至 *E coli* JM 109，質體缺口會自行修復



6-6-3、定點突變之引子設計

由知道定點突變之原理，設計 28~35 不等寡核苷酸引子，利用 primer 5 軟體設計改變所要突變胺基酸之鹼基序列：

- D93G(+) 5'- GGATGGAGGCGCCTGAGCTGGAGTAGG -3'
- D93G(-) 5'- CCTACTCCAGCTCCAGGGCCTCCATCC -3'
- R115Q(+) 5' - CCCAAGTTCTCTGGCCAGATCTACTTCTCGTAC -3'
- R115K(-) 5' - GTACGAGAAGTAGATCTTTGCCAGAGAACTTGGG -3'
- D143G(+) 5' - CAGAACCCGACTGGCCCGAACCGCGAC -3'
- D143N(-) 5' - GTCGCGGTTTCGGGTTAGTCGGGTTCTG -3'
- E154G(+) 5' - CTTCAACTGGTCCGGCTACACGCTCAACG -3'
- E154Q(-) 5' - CGTTGAGCGTGTACTTGGACCAGTTGAAG -3'
- E154D(+) 5' - CTTCAACTGGTCCGACTACACGCTCAACG -3'
- D159G(+) 5' - GTACACGCTCAACGGCTCCGGGCTCTG -3'
- D159N(-) 5' - CAGAGCCCGCAGTTGTGTGAGCGTGTAC -3'
- D170G(+) 5' - CAGTACGCAGGTCGGCATGTTCTCAGCTC -3'
- D170N(-) 5' - GAGCTGAGAACATGTTGACCTGCGTACTG -3'
- D170E(+) 5' - CAGTACGCAGGTCGAGATGTTCTCAGCTC 3'
- D170C(+) 5' - CAGTACGCAGGTCTGCATGTTCTCAGATC -3'
- D184G(+) 5' - GTGCGGCGCGGCGGCGGCACCACACTGAGC -3'
- D184N(-) 5' - GCTCAGTGTGGTGCCGTTGCCGCGCCGCAC -3'
- D221G(+) 5' - CAGACGCGATCCGGCGGTACCGTGCTTCG -3'
- D221N(-) 5' - CGAAGCACGGTACCGTTGGATCGCGTCTG -3'
- Y232A(+) 5' - CGCTCTCTCCACTCGCTGGTGTGCGAGACAGG -3'

Y232F(-) 5'- CCTGTCTCGACACCCGAAGAGTGGAGAGAGCG -3'
Y371A(+) 5'- CGGACGGTAAGGCGTTACGGCTTCGCATTTCGAC -3'
Y371A(-) 5'- GTCGAATGCGAAGCCGTACGCCTTACCGTCCG -3'
D376G(+) 5'- CGGCTTCGCATTCCGGCGACGTGGGACATCAC -3'
D376G(-) 5'- GTGATGTCCCACGTCGCCGAATGCGAAGCCG -3'
D377G(+) 5'- GTGATGTCCCACGCCGTCGAATGCGAAGCCG -3'
D377G(-) 5'- CGGCTTCGCATTTCGACGGCGTGGGACATCAC -3'



6-6-4、定點突變操作步驟

1. Sample reaction 的準備:

(7) 10X reaction buffer : 5 μ l

(8) dsDNA (50 ng/ μ l) 模板(pRSET A_*lphase* 質體模板) : 3.5 μ l

(9) 順股寡核苷酸引子 (125 ng/ μ l) : 1 μ l

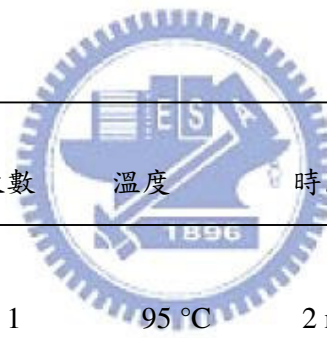
逆股寡核苷酸引子 (125 ng/ μ l) : 1 μ l

(10) 10 mM 的 dNTP mix : 1 μ l

(11) 加入 ddH₂O 使最後體積 : 50 μ l

2. 加入 1 μ l 的 *pfu* DNA 聚合酵素(2.5 U/ μ l)。

3. 進行 PCR 反應



區間	次數	溫度	時間
1	1	95 °C	2 min
2	20	95 °C	30 sec
		56 °C	36 sec
		69 °C	2 min/kb (<i>pfu</i>)
3	1	69 °C	1 min
	1	4 °C	30 min

4. PCR 完成後，取 5 μ l 進行 DNA 電泳分析後，加入 1 μ l 的 Dpn I 限制酵素，於 37 °C 水浴下作用 8~10 小時。

5. 進行轉型反應至勝任細胞，並定序確定突變之鹼基完整正確。

6-7、菌種保存

在 25 %甘油下儲存於 -80 °C 冰箱。

6-8、野生株與突變株 β -1,3-葡聚五糖生產水解糖苷酵素於大腸桿菌系統的過量表現(overexpression)

6-8-1、質體 DNA 的轉型

勝任細胞：大腸桿菌 BL21(DE3) 菌種。

質體：野生株: pRSET_A-*lphase* 和各突變株: D93G、R115K/Q、D143G/N、E154G/Q/D、D159G/N、D170G/N/E/C、D184G/N、D221G/N、Y232A、Y371A、D376G、D377G。

將儲存在-80 °C 的勝任細胞放置冰上，分別加入少量質體，快速混合均勻，於冰上靜置 30 分鐘後，42 °C 水浴 60-65 秒鐘，快速移至冰上靜置 1-2 分鐘後，加入 100 μ L 的 LB 培養液，於 37 °C 培養箱搖晃培養約 1 小時，再將培養後的菌液塗佈在預先回溫的 LB-Amp 培養皿上，放置 37 °C 培養箱約 12 小時(步驟可參考章節 6-4)。

6-8-2、重組酵素的誘導與生長曲線測試

轉型後生長在 LB-Amp 固體培養皿上的大腸桿菌單菌落，挑起置於 5 ml 之 LB-Amp 培養液試管中，培養 8 小時，後取 1 ml 的菌液加入 50 mL LB-Amp 培養液中培養，待菌液之 OD₆₀₀ 達 0.6，分別添加與不添加 2 mM IPTG 誘導，在不同時間點分別取樣做活性測試與蛋白質電泳分析，觀測重組 β -1,3-五糖生產水解糖苷酵素分泌情形與活性。

6-8-3、重組酵素的活性測試

取 1 mL 培養菌液以高速離心，去上層液，沉降的菌體加入少許 20 mM pH 7.0 的磷酸緩衝溶液，以超音波震盪(sonication)打破菌體，高速離心取得上層的胞內酵素，添加約 300 μ L 的 2% 的膠狀卡德蘭膠，37 $^{\circ}$ C 恆溫反應 2 小時，後加入等量體積 DNS 試劑，於 95 $^{\circ}$ C 加熱 10 分鐘顯色，觀測波長 540 nm 吸收值。

DNS (3,5-Dinitrosalicylic acid) 酵素活性的測試方法

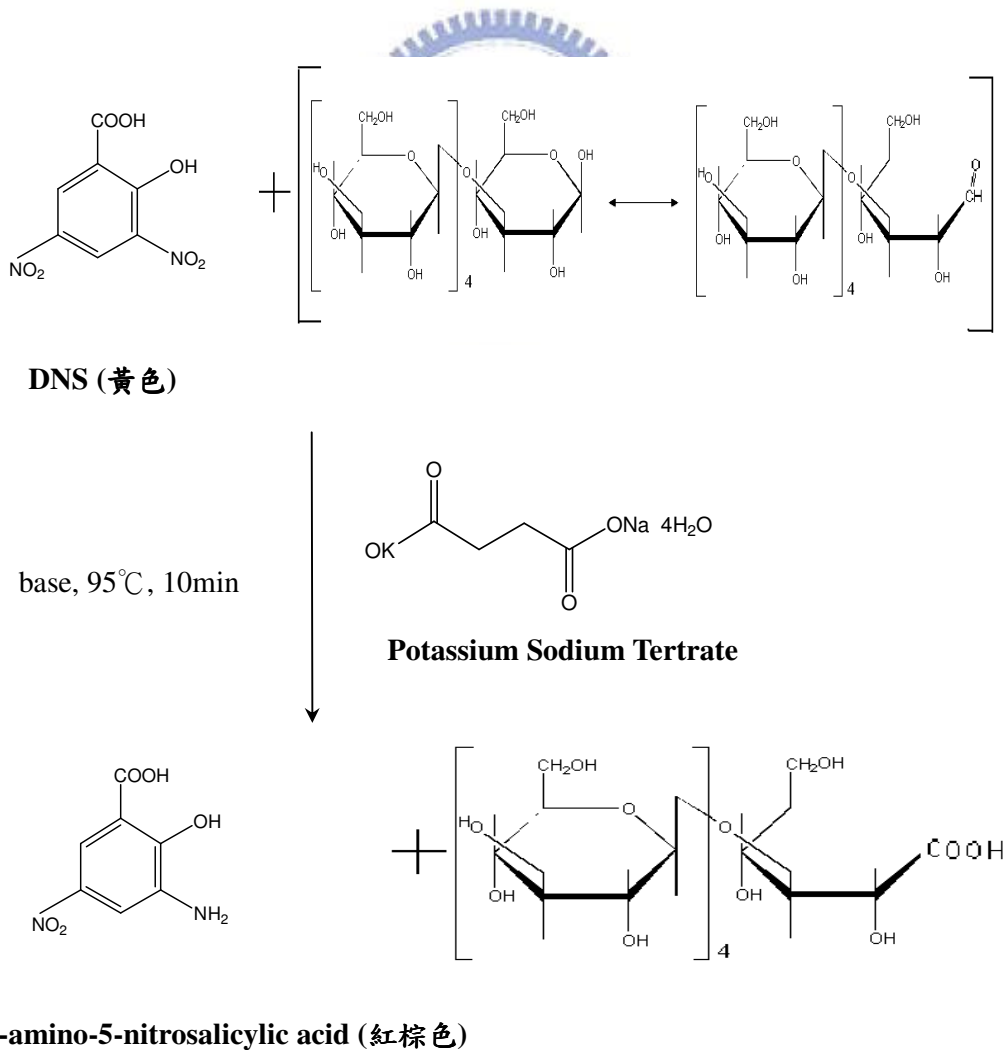
DNS 試劑(需避光): 等量體積的酒石酸鉀鈉溶液與 DNS 溶液混勻。

60% (w/v) 酒石酸鉀鈉溶液(Potassium Sodium Tartrate)

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

3.07 % Sodium Hydroxide

反應機構如下:



6-9、重組 β -1,3-葡聚五糖生產水解糖苷酵素之純化

6-9-1、菌種來源

野生株：由 T_A 載體中選殖人造 LPHase 基因，剪接轉至 pRSET_A 載體 (pRSET_A-*lphase*)，於大腸桿菌 BL21(DE3)表現 β -1,3-葡聚五糖生產水解糖苷酵素；突變株：由野生株經定點突變而來，也於大腸桿菌 BL21(DE3)表現突變株之 β -1,3-葡聚五糖生產水解糖苷酵素。


6-9-2、胞內粗提取液的取得

1. 取-80 °C 存菌適量加入 5 ml 的 LB-Amp 培養液中，於 37 °C 培養箱，轉速 120 rpm 下培養約 8 小時，將此 5 ml 培養液，接種到 1,000 ml LB-Amp (10 % (w/v), 1ml) 培養液中，加入 2 ml 濃度為 500 mM 的 IPTG 溶液 (最後濃度為 1 M)，以 37 °C，培養箱轉速 100 rpm 培養 20~24 小時。在開始純化之前，約取 3 ml 菌液，以 14,000 rpm 離心，倒掉上清液，加入 pH 7.0 之磷酸緩衝液 0.5 ml 溶解菌體，以超音波震盪使菌體破裂(45W, 75 % pulse)，以 14,000 rpm 離心 3 分鐘，將上層液加入 2 % 膠狀卡德蘭膠受質，在 37 °C 下進行 2 小時反應，後加入等量體積 DNS 反應試劑，於 95 °C 加熱 10 分鐘顯色，以確定酵素的活性。
2. 收下菌液在 4 °C 以 7,000 rpm 離心 10 分鐘，棄去上層液。取離心下的菌體，以 10 ml 醋酸鈉緩衝溶液(10 mM, pH 5.8)溶解菌體，搖晃使成均勻懸浮。
3. 加入 10 mM PMSF 於步驟 2.之菌液(10 μ l/ml)，以超音波震盪使菌體破裂 (45W, 75 % pulse)，在 4 °C 以 17,000 rpm 離心 30 分鐘，將上層液與細胞殘骸分開，此上層液即胞內粗提取液。

6-9-3、HiTrap SP 陽離子交換樹脂管柱層析

5. 將 5 ml 胞內粗提取液，導入預先以醋酸鈉緩衝溶液(20 mM, pH 5.8)平衡之 HiTrap SP 陽離子交換樹脂管柱，進行層析分離。
6. 鹽類梯度為 0 到 1 M，流速為 1.5 ml/min，沖提體積為 300 ml。
7. 收集方式為每管 2.5 ml 沖提液。
8. 收集完畢後由試管取樣，加入 2 %膠狀卡德蘭膠受質，在 37 °C 下進行 2 小時反應，加入等量體積 DNS 反應試劑，於 95 °C 加熱 10 分鐘顯色，以測定酵素的活性區域。

6-9-4、HiTrap Q 陰離子交換樹脂管柱層析

- 
7. 將經 HiTrap SP 陽離子交換樹脂管柱層析，所得有酵素活性反應之試管收集，以分子量 10,000 的濃縮管柱濃縮。
 8. 將所得的濃縮液以 1.5 ml 導入預先以磷酸氫二鈉緩衝溶液(10 mM, pH 6.8) 平衡之 HiTrap 除鹽管柱(Desalting column)中，再將 2 ml 磷酸氫二鈉緩衝溶液導入 HiTrap 除鹽管柱中，收集除鹽後的酵素溶液，重複數次直到所有的濃縮液除鹽完畢。
 9. 將 5 ml 步驟 2.之除鹽的酵素溶液，導入預先以磷酸氫二鈉緩衝溶液(20 mM, pH 6.8) 平衡之 HiTrap Q 陰離子交換樹脂管柱，進行層析分離。
 10. 鹽類梯度為 0 到 1 M，流速為 1.2 ml/min，沖提體積為 300 ml。
 11. 收集方式為每管 2.0 ml 沖提液。
 12. 收集完畢後由試管取樣，加入 2 %膠狀卡德蘭膠受質，在 37 °C 下進行 2 小時反應，加入等量體積 DNS 反應試劑，於 95 °C 加熱 10 分鐘顯色，以測定酵素的活性區域。

6-9-5、CM SepharoseTM 離子交換樹脂快速層析管柱

7. 將經 HiTrap Q 陰離子交換樹脂管柱層析，所得有酵素的活性反應之試管收集，以分子量 10,000 的濃縮管柱濃縮。
8. 將所得的濃縮液以 1.5 ml 導入預先以醋酸鈉緩衝溶液(10 mM, pH 5.0)平衡之 HiTrap 除鹽管柱中，再將 2 ml 醋酸鈉緩衝溶液導入 HiTrap 除鹽管柱中，收集除鹽後的酵素溶液，重複數次直到所有的濃縮液除鹽完畢。
9. 將 5 ml 步驟 2. 之除鹽的酵素溶液，導入預先以醋酸鈉緩衝溶液(20 mM, pH 5.0)平衡之 CM SepharoseTM 離子交換樹脂快速層析管柱，進行層析分離。
10. pH 值梯度為 5.0 到 7.0，流速為 1.2 ml/min，沖提體積為 300 ml。
11. 收集方式為每管 2.0 ml 沖提液。
12. 收集完畢後由試管取樣，加入 2 %膠狀卡德蘭膠受質，在 37 °C 下反應 2 小時，加入等量體積 DNS 反應試劑，於 95 °C 加熱 10 分鐘顯色，以測定酵素的活性。



6-9-6、SDS-PAGE 決定蛋白質均質度(homology)

Laemmli 於 1970 年提出 SDS-PAGE 系統中，蛋白質分子在電泳膠片上因分子量大小不同會形成不同的帶狀方式，可以檢驗蛋白質的均質度，也可用來估計其分子量大小。實驗的步驟與製備方法請參閱**章節 2-10**之內容。

6-10、蛋白質分子量與濃度的測定

6-10-1、液相層析-質譜儀(LC/MS)測定蛋白質的分子量

取濃縮且除鹽的 LPHase 純化酵素(濃度約為 2~3 mg/ml)，加入相等體積比例(1:1)的 25 % TFA (三氟醋酸)，混合均勻，置放於 4 °C 中，反應 30 分鐘，使蛋白質完全沉澱。在 4 °C 下，以 14,500 rpm 離心 5 分鐘，棄去上層液。後再加入少量之 5 % TFA (三氟醋酸)清洗沉澱的蛋白質，再次離心並棄去上層液。離心後的沉澱蛋白質，加入 500 μ l 的除水丙酮，離心，棄去上層丙酮液。最後，所得沉澱蛋白質，加入 100 μ l 以 H₂O:1% HCOOH = 90:10 之混合液回溶，以 Q-TOF 液相質譜儀偵測蛋白質分子量。



6-10-2、檢量線的建立

使用 Bicinchoninic Acid (BCA) Assay 建立蛋白質檢量線，做為估計蛋白質質量的標準。室溫下，以 Bicinic acid : Copper (II) sulfate 體積比為 50:10 的混合液做為 Standard Working Reagent (SWR)。將不同濃度標準品牛血清蛋白(bovine serum albumin, BSA)，以體積比 1:20 與 SWR 混合，放置 37 °C 下 30 分鐘，再於室溫下靜置 10 分鐘，測量在波長 562 nm 之吸收值。

6-10-3、純化的野生株與各突變株酵素之濃度測定

建立檢量線同時，將野生株重組 LPHase 酵素分別取 10 μ l 與 20 μ l 於 SWR 中混合，與 BCA 相同條件下測量波長 562 nm 之吸收值。

測量野生株與與各突變株之重組酵素在波長 280 nm 之吸收值。

6-11、 β -1,3-葡聚五糖生產水解糖苷酵素對不同糖苷組成、結構之長鏈聚糖受質反應專一性和水解產物的分析

為了瞭解 β -1,3-葡聚五糖生產水解糖苷酵素對催化糖苷受質的專一性。利用改變糖苷受質的組成，以不同糖苷分子成份和不同結構之長鏈聚糖受質，這些受質包括：curdlan (卡德蘭膠)、laminarin (來自 *Laminaria digitate*)、lichenan (地衣多糖，來自 barley)、xylan (木質聚糖)、cellulose (纖維素)、starch (澱粉)、chitin (幾丁質聚糖)、chitosan (甲殼素)、Lentinan (來自 *Lentinus edodes*)、Schizophyllan (來自 *Schizophyllum commune*)、Pachyman (來自 *Poria cocos*)、Soluble β -glucan (來自 *Saccharomyces cerevisiae*) 等，來測試 β -1,3-葡聚五糖生產水解糖苷酵素對受質催化水解的反應專一性。

步驟：

4. 取純化過的 50 μ l 野生株 LPHase 酵素，分別加入於 300 μ l 以 50 mM 磷酸緩衝溶液 (pH 7.5) 所配製之 2% 膠狀卡德蘭膠受質溶液中，在 37 $^{\circ}$ C 下，反應 2 小時後，加入等量體積 350 μ l DNS 反應試劑後，在 95 $^{\circ}$ C 下加熱 10 分鐘，測定還原糖量，以此為標準值。
5. 同步驟 1.，將卡德蘭膠受質溶液換成其他以不同糖苷分子組成和不同結構之長鏈聚糖所配置的受質溶液，在 37 $^{\circ}$ C 下，反應 2 小時後，加入等量 DNS 反應試劑後，在 95 $^{\circ}$ C 下加熱 10 分鐘，測定還原糖量。
6. 將步驟 2. 所得之還原糖量除以步驟 1. 求出之標準值，所得比值即為酵素對各不同糖苷組成、結構之多糖受質溶液的相對活性。

6-11-1、膠狀卡德蘭膠水解作用反應分析


取 100 μ l 之純化野生株酵素，加入於 900 μ l 以 20 mM 磷酸緩衝液 (pH 7.5) 自製的 2% 膠狀卡德蘭膠受質溶液中，於 37 $^{\circ}$ C 中反應，於各不同反應時間點定

量取樣，利用液相-電噴灑質譜儀和高效率液相層析管柱，作產物分離與定量分析，觀察隨時間改變，反應的水解產物與生成量變化。

6-11-2、寡糖水解作用反應的評估

1. 分別以 20 mM 磷酸緩衝溶液(pH 7.5)，配製 10 mM 之 1-*O*-methyl- β -1,3-laminarihexaose 和 1-*O*-methyl- β -1,3-laminariheptaose 的反應受質。
2. 取 25 μ l 的純化野生株酵素，分別加入於 175 μ l 的步驟 1.之反應受質溶液中，在 37 °C 中反應，隨反應期間定量取樣，利用液相-電噴灑質譜儀分析。
3. 觀察分析隨時間改變，兩單一寡糖受質溶液水解反應的產物變化。

6-12、 β -D-1,3-葡聚五糖葡萄糖苷(Laminaripentaose)之製備



取 5 公克的卡德蘭膠粉末(curdlan, WaKo, Japan)加入 200 ml 的 20 % 酒精溶液，攪拌 20 分鐘後，離心。將沉澱物慢慢加入 100 mM 磷酸/氫氧化鈉緩衝溶液(pH 10.5)約 200 毫升，在室溫下攪拌約 25 分鐘後，以鹽酸中和並離心。將沉澱的白色卡德蘭膠狀物，在溫度約 70~75 °C 下，均勻攪拌 2 小時後，離心，然後以去離子水多次清洗白色膠狀物以去除鹽類。最後，以 50 mM 的 Caps 緩衝溶液(pH 8.5)調整至濃度約 3~4 % 的膠狀卡德蘭膠懸浮液。

將此膠狀卡德蘭膠懸浮液與純化過之野生株 LPHase(蛋白質濃度約為 10 mg/ml)，一同放入分子量為 3,000 Da 的透析膜中，後連同透析膜置於 45 °C 的去離子水中反應 12 小時，反應其間每 4 小時更換緩衝液(所更換之緩衝液收集在一起勿丟棄)，待反應完成後，將透析膜內的溶液倒出並加入 10 倍等體積之酒精，一起置於-20 °C，4 小時，後離心。將上層離心液與先前更換之緩衝溶液，一起利用旋轉濃縮機濃縮至乾燥，以 LC/MS 偵測產物(分子量為 $m/z = 851$)，即為 β -D-1,3-葡聚五糖葡萄糖苷。

6-13、芳香基團 β -1,3-五糖糖苷化合物以及抑制藥物之衍生物的合成

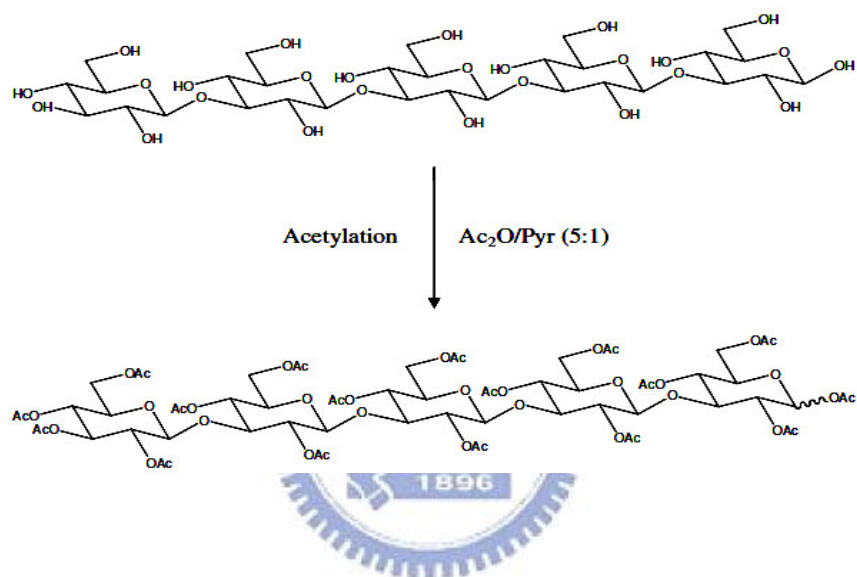
6-13-1、一般敘述

10. 核磁共振光譜(NMR)的測定使用 Bruker DRX-300 型核磁共振光譜儀。所使用的溶劑為 D_2O 時，以 D_2O 之 $\delta 4.72$ 為內標準，使用 $CDCl_3$ 時，以 $CDCl_3$ 之 $\delta 7.24$ 為內標準。化學位移單位為 ppm，耦合常數(coupling constant) 單位 Hz。s 表示單峰(single)，d 表二重峰(doublet)，t 表三重峰(triplet)，q 表四重峰(quarter)，m 表多重峰(multiplet)，b 表寬峰(broad peak)。
11. 色層分析：薄層分析 (TLC) 係使用 Merck Silica gel 60 F₂₅₄ (aluminium sheet TLC)。重力管柱層析分析係使用 ICN SiliTech 32-63 60Å (230~400 mesh) 型矽膠當填充物。
12. TLC 薄層分析之染色劑係使用 Ninhydrin solution (0.3 克 ninhydrin in 100 毫升 n-butanol；add 3 毫升 acetic acid)，Anisaldehyde solution (9.2 毫升 Anisaldehyde、3.75 毫升 Acetic acid、338 毫升 EtOH (95%)、12.5 毫升 H_2SO_4)。
13. 藥品購自於 Sigma-Aldrich、Acros 公司(TCI)。
14. Activated CH Sepharose 4B 購自於 Amersham Bioscience。
15. 反應用有機溶劑購自 TEDIA、Merck。
16. 展開液(developing solvent)皆經自工業級溶劑蒸餾後使用。
17. 減壓濃縮機係使用 EYELA ROTARY VACUUM EVAPORATOR N-N series 型旋轉濃縮機。
18. 冷凍乾縮係使用 PANCHUM FREEZE DRYER CT-series 型冷凍乾縮機。

6-13-2、對硝基苯 β -D-1,3- 葡聚 五糖葡萄糖苷 化合物

(*p*-nitrophenyl- β -D-1,3-pentaglucoopyranoside)的合成

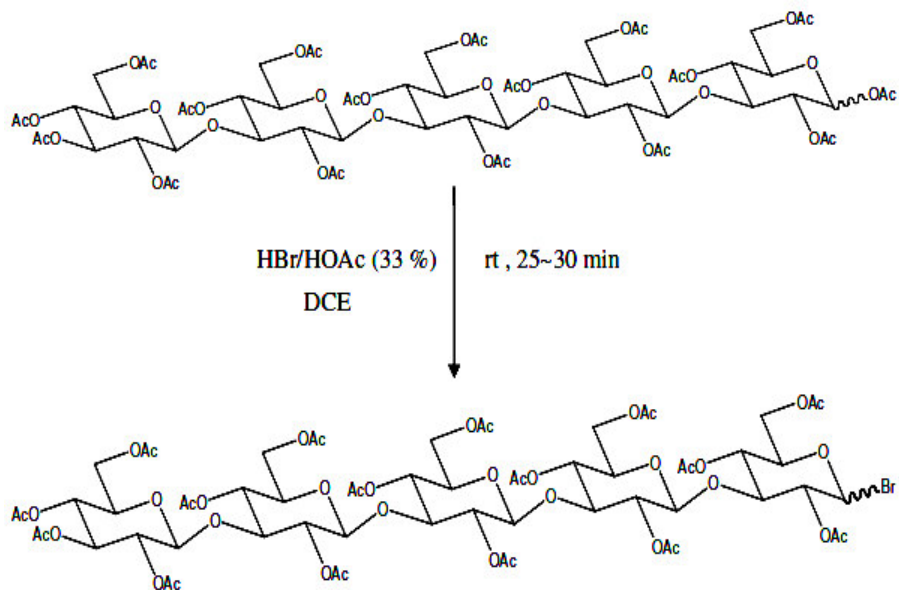
O-acetyl- β -D-1,3-pentaglucoopyranoside 的合成 (OAc 保護基
的合成, Acetylation)



方驟:

5. 取自製 β -D-1,3-五糖葡萄糖苷 3 克，加入除水過之吡啶(15 mL)，蓋血清塞、插上氮氣球，並放置冰浴 15 分鐘。
6. 取醋酸酐 60 ml (Acetyl anhydrate molar equivalents)，慢慢的滴入反應瓶中，加完醋酸後，移開冰浴，反應 overnight。
7. 以 TLC 確認反應起始物皆已消失，則中止反應。減壓抽氣，濃縮至黏稠狀。以 1,2-二氯乙烷 (1,2-dichloroethane, DCE)當作溶劑，以水萃取兩次，再依序以 1N HCl 水溶液飽和碳酸氫鈉水溶液以及飽和食鹽水萃取；並合併有機層，加入無水硫酸鎂(MgSO₄)除水，減壓抽氣濃縮至黏稠狀。
8. 以沖提液 Hexane/DCE=9/1 到 Hexane/DCE=3/7 的極性梯度，進行管柱層析法純化，並減壓抽氣濃縮至乾，可得 2.7 克產物，產率 88 %。

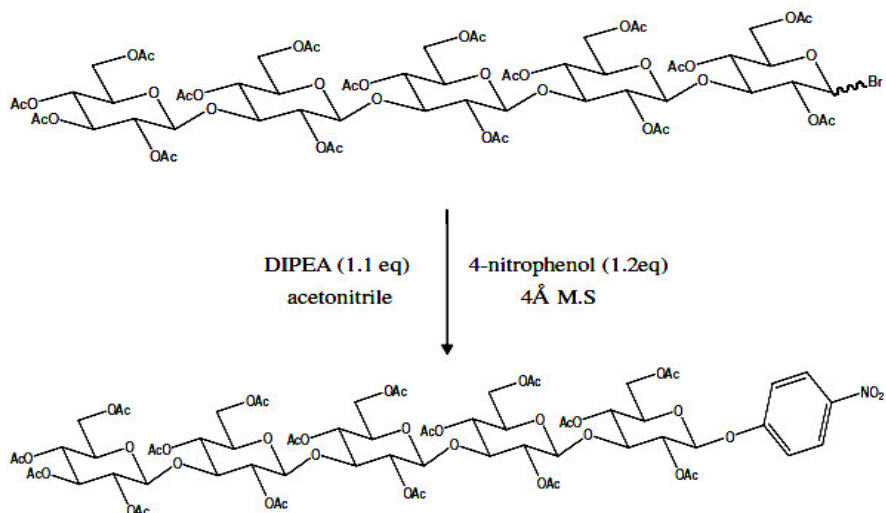
1-bromo-*O*-acetyl- β -D-1,3-pentaglucopyranoside 的合成



方驟:

1. 取上述產物 0.5 克，加入少量除水過之 1,2-二氯乙烷，使之完全溶解，放入磁石、蓋血清塞、插氮汽球以及在反應瓶外包上鋁箔。
2. 取 3 ml 之 HBr/HOAc (33% HBr 在醋酸中)，逐滴的加入反應瓶中，加完 HBr 後，在室溫下反應 25~30 分鐘。
3. 以 TLC 確認反應起始物皆已消失，則中止反應，加入 25 ml 之 1,2-二氯乙烷當作溶劑，進行萃取；先以冰和水進行萃取，確定冰在萃取完後還未完成融解（接下來的萃取均需注意到此點）；再依序以飽和碳酸氫鈉水溶液、1N HCl 水溶液以及飽和食鹽水各萃取一次，並合併有機層，加入無水硫酸鎂(MgSO₄)除水，減壓抽氣濃縮至發泡狀，可得到 0.47 克，產率約為 85%。因此產物並不穩定所以不進一步作純化直接做與芳香環的偶合(coupling)反應

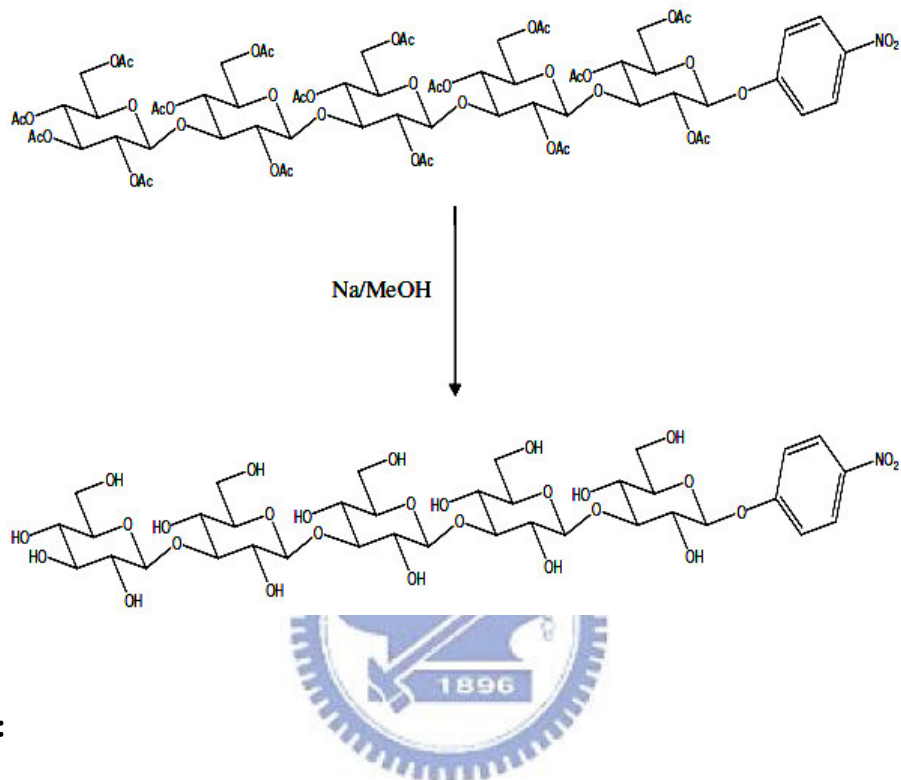
O-acetyl-*p*-nitrophenyl- β -D-1,3-pentaglucoopyranoside 的合成



方驟:

1. 取 1.2 eq 之 *p*-nitrophenol 和 1.1 eq 之 DIPEA (diisopropyl-ethylamine) 以及 4 Å 分子篩 0.15 克 (4 Å molecular sieve) 於反應瓶中，加入 15 ml 除水乙腈 (acetonitrile)，插上氮汽球並外包鋁箔。
2. 將上一步驟所合成的溴化之產物，加入以 2 ml 除水之乙腈 (acetonitrile) 溶解，打入步驟 1. 之反應瓶；再以 3 ml 除水之乙腈潤洗，再打入反應瓶內，室溫反應 overnight。
3. 以 TLC 確認反應，起始物皆已消失則中止反應，減壓抽氣濃縮至黏稠狀後，以 1,2-二氯乙烷當作溶劑，並以 1N NaOH 水溶液萃取，直至水層無明顯顏色呈透明澄清。再依序以 1N HCl 水溶液以及飽和食鹽水各萃取一次，並合併有機層，加入無水硫酸鎂 (MgSO₄) 除水，減壓抽氣濃縮至發泡狀。
4. 以沖提液 Hexane/DCE=9/1 到 Hexane/DCE=3/7 的極性梯度進行管柱層析法純化並減壓抽氣濃縮至乾可得 0.33 克產物產率 66 %。

O-hydrohyl-*p*-nitrophenyl- β -D-1,3-pentaglucopyranoside 的 合成 (去保護基, Deacetylation 反應)

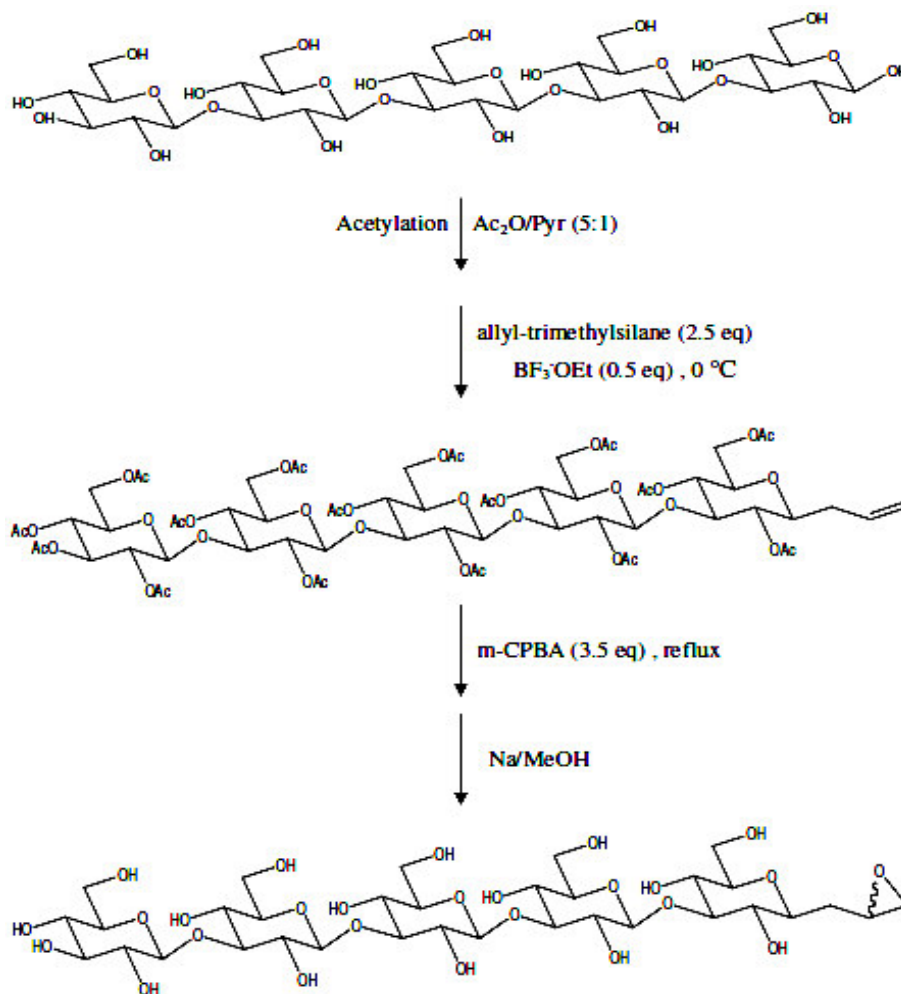


方驟:

將產物 *O*-acetyl-4-nitrophenyl- β -D-1,3-pentaglucopyranoside (0.25 g) 加入含少量 Na 和無水甲醇溶液(30 ml)攪拌反應 30 分鐘之後,此時有懸浮物產生,以抽氣過濾抽乾溶液,並以無水甲醇溶液清洗沉澱物 1-2 次,抽乾溶液,收集沉澱物,可得產物 *O*-hydrohyl-4-nitrophenyl- β -D-1,3-pentaglucopyranoside (*p*-NLPG) 其產率約為 89 %。

6-13-3、*O*-hydroxyl-1-(2,3-epoxypropyl)- β -1,3-D-pentaglucoopyranoside

(EPLPG) 的合成



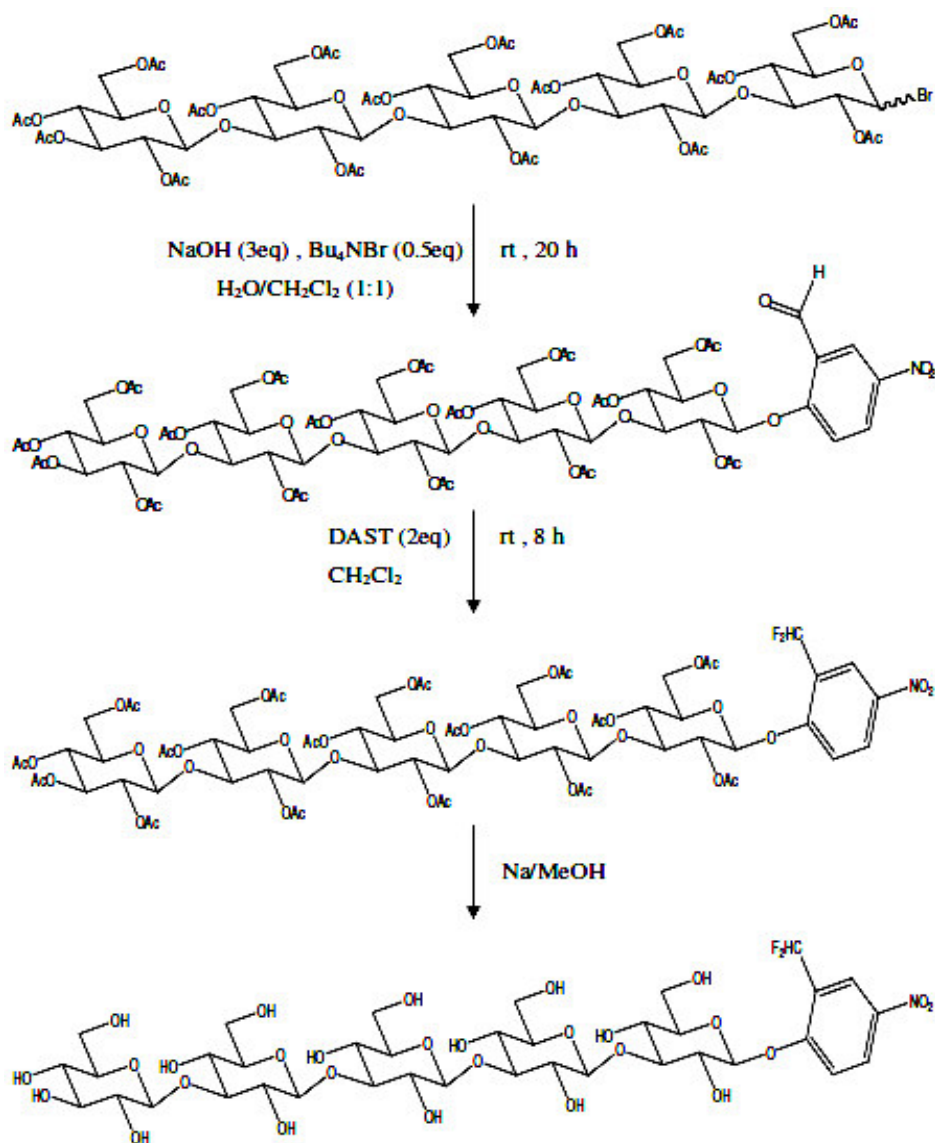
方驟：

1. 取 0.5 克之 *O*-acetyl- β -D-1,3-pentaglucoopyranoside 溶於 15 ml 除水之乙腈中，放入磁石、蓋血清塞以及插上氮氣汽球。
2. 室溫打入 2.5 eq 之 allyl-trimethylsilane，之後冰浴 30 分鐘。
3. 於 0 °C 下打入 0.5 eq 之 $\text{BF}_3\cdot\text{OEt}$ ，0 °C 反應 5 小時後移開冰浴，室溫反應 48 小時。

4. 以 TLC 確認反應，起始物皆已消失則中止反應，將反應瓶置於 0 °C 下 15 分鐘，加入飽和碳酸氫鈉水溶液，慢慢中和直到 pH 值約為 7。
5. 減壓抽氣濃縮至黏稠狀後，加入 1,2-二氯乙烷當作溶劑，以水萃取一次，再依序以 1N HCl 水溶液、飽和碳酸氫鈉水溶液以及飽和食鹽水萃取並合併有機層加入無水硫酸鎂(MgSO₄)除水，減壓抽氣濃縮至黏稠狀。
6. 以沖提液從 Hexane/DCE=9/1 到 Hexane/DCE=3/7 的極性梯度，進行管柱層析法純化；可得化合物，產率 79 %。
7. 架迴流系統，取步驟 6 之產物化合物加入 20 ml 之 1,2-二氯乙烷在氮氣系統下溫度 49~50 °C，迴流 30 分鐘。
8. 加入 3.5 eq 之間氯過氧苯甲酸(meta-Chloroperoxybenzoic acid, m-CPBA)，繼續迴流反應，以 TLC 確認反應起始物皆已消失則中止反應(約 5~6 小時)，冰浴下加入 20 ml 水，中和過多的 m-CPBA。
9. 以 1,2-二氯乙烷當作溶劑，以水萃取一次，再依序以 1N HCl 水溶液、飽和碳酸氫鈉水溶液以及飽和食鹽水萃取，並合併有機層，加入無水硫酸鎂(MgSO₄)除水，減壓抽氣濃縮至黏稠狀。
10. 以沖提液從 Hexane/DCE=9/1 到 Hexane/DCE=3/7 的極性梯度，進行管柱層析法純化；可得化合物，產率 83 %。
11. 取步驟 10.之產物，進行去保護的反應，加入無水甲醇 20 ml 放入磁石、蓋上血清塞、插上氮氣球，冰浴 30 分鐘。
12. 打開血清塞，加入少量之鈉，0 °C 下劇烈攪拌，約 25~30 分鐘，此時有懸浮物漸產生，以 TLC 確認反應，觀察到保護基已除去則立即中止反應。

6-13-4、1-*O*-(2-difluoromethyl-4-nitrophenyl)- β -1,3-D-pentaglucoopyranoside

(2DFMNLPG) 的合成



步驟：

1. 取 0.5 克 1-bromo-*O*-acetyl- β -D-1,3-pentaglucoopyranoside 加入 1.2 eq 之 5-Nitrosalicylaldehyde 溶於 20 ml 二氯甲烷中，放入磁石、蓋血清塞以及插上氮氣汽球並用鋁箔紙包覆反應瓶。

- 室溫打入等體積 20 ml, 3 eq 之氫氧化鈉水溶液, 後慢慢打入 0.5 eq 之 Bu_4NBr (Tetra-n-butylammonium Bromide), 之後室溫反應 30~35 小時。
- 以 TLC 確認反應, 起始物皆已消失則中止反應, 以 1,2-二氯乙烷當作溶劑, 以水萃取一次後, 將有機層收集, 置於 0 °C 下, 慢慢中和直到 pH 值約為 7。以減壓抽氣濃縮至黏稠狀後, 加入 1,2-二氯乙烷當作溶劑, 並以 1N NaOH 水溶液萃取, 直至水層無明顯顏色呈透明澄清。再依序以 1N HCl 水溶液以及飽和食鹽水各萃取一次, 並合併有機層, 加入無水硫酸鎂 (MgSO_4) 除水, 減壓抽氣濃縮至發泡狀。
- 以沖提液 Hexane/DCE=9/1 到 Hexane/DCE=3/7 的極性梯度, 進行管柱層析法純化, 並減壓抽氣濃縮至乾可得 0.33 克產物產率 66 %。
- 將步驟 4 之產物加入 2 eq 之 DAST ((Diethylamino)sulfur Trifluoride) 和 20 ml 除水之二氯甲烷, 放入磁石、蓋血清塞以及插上氮氣汽球, 反應 8 小時。
- 以 TLC 確認反應, 起始物皆已消失則中止反應; 以 1,2-二氯乙烷當作溶劑, 以水萃取一次, 再依序以 1N HCl 水溶液、飽和碳酸氫鈉水溶液以及飽和食鹽水萃取, 並合併有機層, 加入無水硫酸鎂 (MgSO_4) 除水, 減壓抽氣濃縮至黏稠狀。
- 以沖提液從 Hexane/DCE=9/1 到 Hexane/DCE=3/7 的極性梯度, 進行管柱層析法純化, 可得產物, 產率 93%。
- 將步驟 7 之產物, 進行去保護的反應, 加入無水甲醇 20 ml, 放入磁石、蓋上血清塞、插上氮氣球, 冰浴 30 分鐘。
- 打開血清塞, 加入少量之鈉, 4 °C 下劇烈攪拌, 約 25~30 分鐘, 此時有懸浮物漸產生, 以 TLC 確認反應, 觀察到保護基已除去則立即中止反應。

6-14、重組之 β -1,3-葡聚五糖生產水解糖苷酶的特性研究

6-14-1、溫度對酶活性的影響

本實驗之目的在得知，於相同 pH 值不同溫度下，溫度的改變對 β -1,3-五糖生產水解糖苷酶活性的影響，以了解酶活性隨溫度變化的情形。

步驟：

5. 取純化過的 50 μ l 野生株 LPHase，加入 300 μ l 以磷酸緩衝溶液(50 mM, pH 7.5)所配置之 2 % 膠狀卡德蘭膠溶液中，在 16 $^{\circ}$ C 下反應 2 小時，加入等體積 350 μ l DNS 反應試劑後，在 95 $^{\circ}$ C 下加熱 10 分鐘，測定還原糖量。
6. 分別在 25 $^{\circ}$ C, 37 $^{\circ}$ C, 45 $^{\circ}$ C, 55 $^{\circ}$ C, 65 $^{\circ}$ C, 75 $^{\circ}$ C, 85 $^{\circ}$ C, 95 $^{\circ}$ C 重複步驟 1.，得不同溫度下之還原糖量。
7. 以不同之溫度之還原糖量對溫度作圖，即可得知溫度的改變對野生株 LPHase 活性的影響。

6-14-2、溫度對酶穩定度的影響(Thermostability)

本實驗的目的在於了解相同 pH 值，不同溫度下， β -1,3-五糖生產水解糖苷酶的穩定度受溫度變化的影響，以便了解酶穩定的溫度區間。

步驟：

6. 取純化過的 50 μ l 野生株 LPHase，加入 300 μ l 以磷酸緩衝溶液(50 mM, pH 7.5)所配置之 2 % 膠狀卡德蘭膠溶液中，在 37 $^{\circ}$ C 下反應 2 小時後，加入等體積

350 μ l DNS 反應試劑後，在 95 $^{\circ}$ C 下加熱 10 分鐘，測定還原糖量，以此為標準值。

7. 將純化過的 500 μ l 野生株 LPHase 於 25 $^{\circ}$ C 下放置 15、30、45、60、90、120、150、180、210、240 分鐘，再取出定量酵素，同步驟 1. 的方式測定其反應還原糖量。
8. 同步驟 2.，測得酵素在 37 $^{\circ}$ C、45 $^{\circ}$ C、55 $^{\circ}$ C、60 $^{\circ}$ C、65 $^{\circ}$ C、75 $^{\circ}$ C 各個溫度下，存放各不同時間點後的殘餘活性。
9. 將各溫度下的殘餘活性對時間作圖，即可得到在各個溫度下，不同時間中酵素殘餘活性的變化，此圖即可顯示出各溫度下的酵素穩定度。

6-14-3、酸鹼度對酵素活性的影響

本實驗的目的在於了解相同溫度下，酸鹼度對酵素活性的影響，以了解酵素作用的最佳酸鹼值範圍。所配置的不同 pH 值緩衝溶液為：

Glycine/HCl (50 mM, pH 2、2.5、3)、Citric (50 mM, pH 3.5)、NaOAc (50 mM, pH 4、4.5、5、5.5)、MES (50 mM, pH 5.5、6)、 Na_2HPO_4 (50 mM, pH 6.5、7、7.5)、Hepes (50 mM, pH 7.5、8)、Tris (50 mM, pH 8、8.5)、Glycine/NaOH (50 mM, pH 9、9.5、10)、Caps (50 mM, pH 10、10.5)、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaOH}$ (50 mM, pH 11、11.5)

步驟：

4. 配製 300 μ l 各不同 pH 值的 2% 膠狀卡德蘭膠受質溶液，於 37 $^{\circ}$ C 下預熱。
5. 加入 50 μ l 純化的野生株 LPHase，在 37 $^{\circ}$ C 下反應 2 小時，後加入等體積 350 μ l DNS 反應試劑後，在 95 $^{\circ}$ C 下加熱 10 分鐘，測定還原糖量。
6. 以酵素的活性對 pH 值作圖，即可得知活性隨 pH 值變化的關係圖。

6-14-4、酸鹼度對酵素穩定度的影響 (pH stability)

本實驗的目的在了解酵素處於不同酸鹼值的溶液中，其穩定度隨時間變化的情形。所配置的不同 pH 值緩衝溶液為：

Glycine/HCl (50 mM, pH 2、3)、NaOAc (50 mM, pH 4、5)、MES (50 mM, pH 6)、 Na_2HPO_4 (50 mM, pH 7)、Tris (50 mM, pH 8)、Glycine/NaOH (50 mM, pH 9)、Caps (50 mM, pH 10)、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaOH}$ (50 mM, pH 11)

步驟：

7. 取純化過的 50 μl 野生株 LPHase，加入 300 μl 以磷酸緩衝溶液(50 mM, pH 7.5)所配置之 2 %膠狀卡德蘭膠溶液中，在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下，反應 2 小時後，加入等量體積 350 μl DNS 反應試劑後，在 95 $^{\circ}\text{C}$ 下加熱 10 分鐘，測定還原糖量，以此為標準值。
8. 取磷酸緩衝溶液 (50 mM, pH 7.0) 在 25 $^{\circ}\text{C}$ 下預熱。
9. 加入純化過之野生株 LPHase 混合均勻，在 4 小時內，於 25 $^{\circ}\text{C}$ 下，每隔 1、15、30、45、60、90、120、150、180、210、240 分鐘，取出定量的酵素加入同步驟 1.之磷酸緩衝溶液(50 mM, pH 7.5)所配置之 2 %膠狀卡德蘭膠，在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下，反應 2 小時後，加入等量體積 DNS 反應試劑後，在 95 $^{\circ}\text{C}$ 下加熱 10 分鐘，測定還原糖量。
10. 將步驟 3.所得之還原糖量除以步驟 1.求出之標準值，所得比值即為 25 $^{\circ}\text{C}$ 下，酵素在磷酸緩衝液中置放不同時間的殘餘活性。
11. 重複步驟 2.至 4.，求得酵素在其它不同 pH 值緩衝溶液中，所置放不同時間後酵素的殘餘活性。
12. 以此殘餘活性對時間作圖，此圖可顯示酵素在不同 pH 值下的穩定度。

6-14-5、金屬離子及試劑對酵素活性的影響

本實驗的目的在於瞭解酵素處於不同的金屬離子中其濃度對活性的變化情形各離子與還原劑如： Cu^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Co^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Hg^{2+} 、EDTA、DTT 和 2-mercaptoethanol。

步驟：

1. 取純化過的 50 μl 野生株 LPHase，加入 300 μl 以去離子水配製之 2 % 膠狀卡德蘭膠溶液中，在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下，反應 2 小時後，加入等量體積 350 μl DNS 反應試劑後，在 95 $^{\circ}\text{C}$ 下加熱 10 分鐘，測定還原糖量，以此為標準值。
2. 同步驟 1.，將去離子水換成以配製含 2 mM 各金屬離子和還原劑之 2 % 膠狀卡德蘭膠溶液，在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下，反應 2 小時後，加入等量 DNS 反應試劑後，在 95 $^{\circ}\text{C}$ 下加熱 10 分鐘，測定還原糖量。
3. 將步驟 2. 所得之還原糖量除以步驟 1. 求出之標準值，所得比值即為酵素在含 2 mM 之各金屬離子與抑制劑溶液中相對活性，藉此判定各種金屬離子與還原劑的存在對於 LPHase 的活性是否有影響。

6-15、 β -1,3-葡聚五糖生產水解糖苷酵素動力學之研究

一般而言 K_m 值的求法可用以下兩種方法求得：

Michaelis-Menten equation 及雙倒數作圖法 (double reciprocal plot)，敘述如下⁽¹⁹⁾：



依 steady-state 假設可得以下速率方程式：

$$V = V_{max} [S] / K_m + [S] \quad V_{max} = k_{cat} \times [E]_t$$

$[E]_t$ ：總酵素濃度

k_{cat} ：速率決定步驟速率常數

兩邊取雙倒數，即為雙倒數作圖法：

$$1/V = K_m/V_{max} \cdot 1/S + 1/V_{max}$$

V_{max} ：受質濃度無限大時反應速率所趨近的極限速率值

K_m ：速率為極限速率一半時的受質濃度

雙倒數作圖中斜率為 K_m/V_{max} ，縱軸之截距為 $1/V_{max}$ ，而橫軸之交點為 $-1/K_m$ ，斜率對縱軸截距的比值即為 K_m 。

動力學反應條件：野生株 LPHase 酵素 (濃度為 2.7 μM) 和各突變株 LPHase 酵素 (濃度為 2.5~4.5 μM)，在 50 mM 磷酸緩衝溶液 (pH 7.1) 下，對不同濃度之 *p*-NLPG (0.5~10 mM， $\Delta\epsilon$: 7280 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ，觀測波長為 400 nm)，進行催化水解反應，以 UV 吸收光譜儀觀測吸光值變化，計算反應的初始速率 (initial velocity, V_0)，並以雙倒數作圖求 k_{cat} 與 K_m 之值。

6-15-1、酸鹼度對野生株與突變株之 β -1,3-葡聚五糖生產水解

糖苷酵素活性 k_{cat} 、 K_m 影響 (pH-profile 的測定)

步驟:

5. 取不同 pH 值的緩衝溶液 Glycine/HCl (50 mM, pH 2、2.5、3)、Citric (50 mM, pH 3.5)、NaOAc (50 mM, pH 4、4.5、5、5.5)、MES (50 mM, pH 5.5、6)、 Na_2HPO_4 (50 mM, pH 6.5、7、7.5)、Hepes (50 mM, pH 7.5、8)、Tris (50 mM, pH 8、8.5)、Glycine/NaOH (50 mM, pH 9、9.5、10)、Caps (50 mM, pH 10、10.5)、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaOH}$ (50 mM, pH 11、11.5), 在 25 °C 預熱。
6. 加入濃度為 2.7 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 之純化過野生株 LPHase 酵素及不同濃度之受質 *p*-NLPG 0.5 mM~10 mM, 40 °C 下進行水解反應, 以 UV 吸收光譜儀觀測波長 348 nm 吸光值的增加率, 記錄其零級初始反應速率(initial velocity)。
7. 以此酵素活性之零級初始反應速率, 計算求得 k_{cat} 與 K_m 之值並對 pH 值作圖, 可得活性隨 pH 值變化的關係圖。
8. 將野生株 LPHase 酵素改換為突變株 E154Q、D170N 和 R115Q 酵素, 同步驟 1.至 3., 各求其 k_{cat} 與 K_m 之值並對 pH 值作圖。

6-15-2、陰離子親核劑對突變株酵素活性的影響

步驟:

4. 取 50 μl 純化過的突變株 E154G 和 D170G 酵素, 加入 300 μl 以去離子水配製之 2% 膠狀卡德蘭膠, 在 37 °C 下, 反應 4 小時後, 加入等量 DNS 試劑反應, 在 95 °C 下加熱 10 分鐘, 測定還原糖量, 以此為標準值。
5. 配製不同濃度 0.01~4 M 的各陰離子親核劑(疊氮鈉和甲酸鈉)之 2% 膠狀卡德蘭膠, 於 pH 7.5 的 50 mM 磷酸緩衝溶液。

6. 取 50 μl 純化過的突變株 E154G 和 D170G 酵素，分別加入步驟 2. 中，各不同條件、濃度之受質溶液中，在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下反應 4 小時後，加入等體積之 DNS 試劑反應，在 95 $^{\circ}\text{C}$ 下反應 10 分鐘後，觀察波長 540 nm 的吸光值增加率。
7. 將兩突變株 E154G 和 D170G 酵素，對不同濃度的陰離子親核劑於 540 nm 的吸光值作圖，觀測陰離子親核劑對兩突變株 E154G 和 D170G 酵素之活性復活有何作用。

步驟：

1. 由於疊氮可以增加突變酵素之 k_{cat} 值到 72 倍。所以，我們選擇濃度 1 M 疊氮對合成之 *p*-NLPG 糖苷受質不具有催化反應的突變株 D170G 酵素，進行酵素的化學活性復活反應。希望進一步了解疊氮在酵素反應機制中所扮演的角色。
2. 取含有 1 M 疊氮之不同 pH 值的緩衝溶液 Na_2HPO_4 (50 mM, pH 6.5、7、7.5)、Hepes (50 mM, pH 7.5、8)、Tris (50 mM, pH 8、8.5)、Glycine (50 mM, pH 9、9.5、10)、Caps (50 mM, pH 10、10.5)、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaOH}$ (50 mM, pH 11、11.5)，在 25 $^{\circ}\text{C}$ 預熱。
3. 加入固定量純化過的突變株 D170G 酵素 15 μl (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) 和不同濃度之受質 *p*-NLPG 0.5 mM~10 mM，40 $^{\circ}\text{C}$ 下進行水解反應，以 UV 吸收光譜儀觀測波長 348 nm 吸光值的增加率，分析其初始反應速率(即 k_{cat} 值)。
4. 以此突變株 D170G 酵素活性，所求得 k_{cat} 與 K_{m} 之值對 pH 值作圖，得化學活性復活隨 pH 值變化的關係圖。

6-16、抑制劑與酵素之抑制作用活性測定

本實驗以合成之 *O*-hydroxyl-1-(2,3-epoxypropyl)- β -1,3-D-pentaglucopyranoside (EPLPG) 與 1-*O*-(2-difluoromethyl-4-nitrophenyl)- β -1,3-D-pentaglucopyranoside

(2DFMNLPG)，來進行酵素抑制，此類型之抑制劑通常為不可逆抑制劑，預期在酵素活化中心，於催化過程中與重要胺基酸殘基(nucleophile 或 general acid/base)產生共價鍵結，如此，可以直接之證據證明酵素催化反應重要胺基酸殘基之位置。

抑制作用之步驟：

1. 分別各取 1 ml 純化之野生株 LPHase 酵素，同時各加入 1 ml 之 10 mM 上述兩抑制劑與 1 ml 之無菌去離子水，置於 37 °C 中預熱混合。
2. 隨各不同時間點，逐一對步驟 1.之三個酵素反應液定量取樣，與 2 %膠狀卡德蘭膠，在 37 °C 的反應標準活性測試系統下，測定該三個有、無加入抑制劑的酵素反應液之還原糖量。
3. 作圖比較有、無加抑制劑之酵素，彼此在各不同時間點的相對殘餘活性比。
4. 另外，製備一相同反應條件與時間下，LPHase 酵素分別與兩抑制劑混合樣品，待步驟 1.~4.活性追蹤實驗結束，以 LC/MS/MS 偵測蛋白質分子量的變化。

6-17、氫核磁共振光譜研究 β -1,3-葡聚糖生產水解糖苷酵素突變株

D170G 之化學活性復活，觀測與疊氮反應後之產物立體選擇性

步驟：

10. 以 D₂O 製備含 1 M 疊氮鈉之磷酸緩衝溶液(20 mM，pD 7.5)，再以此緩衝溶液配所需的受質卡德蘭膠溶液。
11. 將適量純化之突變株 D170G 酵素由水溶液置換為步驟 1.之緩衝溶液。
12. 取出適量不含水的酵素溶液，偵測對卡德蘭膠的活性，用以判定於 NMR 反應中所使用受質的濃度。
13. 取 0.5 ml 受質卡德蘭膠放入 NMR 管中，以此為對照組。
14. 加入適量酵素，開始觀測反應之進行。在 0 ~ 200 分鐘之間的各時間點，掃描

觀測反應作用的進行程度。由所得各圖譜中，觀察各水解糖基產物之 C1 分裂吸收峰化學位移(chemical shift)的消長變化，以分析此突變株 D170G 酵素在化學活性復活作用下，對反應基質催化之立體特異性。

6-18、氫核磁共振光譜研究 β -1,3-葡聚五糖生產水解糖苷酵素突變株 D170E 反應後之產物立體選擇性

步驟：

7. 以 D₂O 製備磷酸緩衝溶液(20 mM, pD 7.5)，再以此緩衝溶液配所需的受質卡德蘭膠溶液。
8. 將適量純化之突變株 D170E 酵素由水溶液置換步驟 1.之緩衝溶液。
9. 取出適量不含水的酵素溶液，偵測對卡德蘭膠的活性，用以判定 NMR 反應中所使用受質的濃度。
10. 取 0.5 ml 受質卡德蘭膠放入 NMR 管中，以此為對照組。
11. 加入適量酵素，開始觀測反應之進行。在 0 ~ 200 分鐘之間的各時間點，掃瞄觀測反應作用的進行程度。由所得圖譜中，觀察化學位移(chemical shift)為 5.24 和 4.68 的消長以分析此突變株 D170E 酵素對基質之催化立體特異性。

6-19、建構含標示鍵結之 β -1,3-葡聚五糖生產水解糖苷酵素突變株 D170C 之反應活性、機制之研究

步驟：

1. 於兩燒杯各稱取 1.21 克 Tris (約為 100 mM) 溶於 100 ml 之去離子水，此時溶液 pH 值約為 9.4~9.6，在分別慢慢加入 0.19 克醋酸碘 (Iodoacetic acid) 與

- 0.185 克二硫代二乙酸(Dithiodiglycolic acid) (各約為 10 mM)，並攪拌至溶解 (*注意勿以強酸或強鹼調整溶液酸鹼值)，待醋酸碘與二硫代二乙酸完全溶解後，溶液 pH 值約為 8.5 和 7.7。
2. 將步驟 1.所配製之兩溶液，分別加入等量的純化之突變株 D170C LPHase 酵素(濃度為 4.85 mg/ml)，置於 25 °C 中進行鍵結反應。
 3. 反應過程中，取適當量，以液相串聯質譜儀偵測蛋白質反應的分子量增加變化(偵測方法參考步驟**章節 6-10-1**)。
 4. 待突變株 D170C 酵素中，胺基酸 Cys 側鏈之-SH 基團，分別完全鍵結成為 -SCH₂COO⁻與-S-SCH₂COO⁻後，以磷酸緩衝溶液(5 mM, pH 7.5)進行反應液之透析，以除去未作用反應之醋酸碘與二硫代二乙酸。
 5. 將此透析有標示的兩修飾突變株 D170C 酵素，取適當濃度體積與 2 %卡德蘭膠進行反應並以 DNS 試劑測試活性變化。同時，亦以含 15 %乙醇之 2 %卡德蘭膠進行反應，並利用液相-電噴灑質譜儀偵測反應產物的分子量變化，觀察是否有轉糖反應。



6-20、CD (circular dichroism)光譜觀測野生株和突變株之二級結構

生物基礎分子一般都具有手性，也都具有光學活性。手性分子都具有光學活性，當單色左旋(AL)與右旋(AR)的圓偏振光通過某一種手性樣品時，該樣品對左、右旋圓偏振光的吸收不同，這叫做圓二色性。其差值 $\Delta A = \Delta A_L - \Delta A_R$ 稱為圓二色值，按波長掃描就得到了圓二色譜 (CD 譜)。藉此儀器判定蛋白質二級結構是否因定點突變而改變否。實驗的方法與計算公式同**章節 2-21** 所描述之內容。

6-21、 β -1,3-葡聚五糖生產水解糖苷酵素之蛋白質晶體研究

6-21-1、自然野生株(wild type)蛋白質表現

同前敘述 LPHase 之過量表現與純化

6-21-2、硒化甲硫胺酸(Selenomethionine)蛋白質表現

1. 將含有 pRSET_A-*lphase* 質體的大腸桿菌 BL21(DE3)表現菌株養在 10 ml 的 LB 培養液(每升 LB 培養液中含 10 g Tryptone、5 g Yeast Extract 和 10 g NaCl)中，以 37 °C 培養 12 ~ 14 小時，隨後於 4 °C 離心收集細菌菌體，去除上清液後，以 1 倍的 M9 鹽類培養液 (每升 M9 鹽類培養液中含 12.8 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、3 g KH_2PO_4 、1 g NH_4Cl 和 0.5 g NaCl) 3 ~ 5 ml 回溶菌體。如此重複 2 ~ 3 次，充分徹底地將 LB 培養液完全置換成 M9 鹽類培養液⁽²⁰⁰⁾。
2. 於每升的 M9 鹽類培養液中加入 M9 鹽類培養液添加物(2 ml 的 1M MgSO_4 、0.1 ml 的 1M CaCl_2 、10 ml 的 20 % glucose 及 0.5 % (w/v) thiamine 溶液 0.1 ml)，並加入 1 ml 的抗生素 Ampicillin (100 mg/ml)使最終濃度為 100 $\mu\text{g/ml}$ ，最後將 10 ml 小量培養並以 M9 鹽類培養液回溶的菌液倒入至一升的 M9 鹽類培養液中，於 37 °C 培養 10 ~ 11 小時，使吸光值 OD_{600} 達到 0.6 ~ 0.8，接著進行甲硫胺酸合成途徑的負回饋抑制(feedback inhibition)，並且誘導表現硒化甲硫胺酸蛋白質。
3. 在每升的培養液中加入 L-Threonine、L-Lysine 和 L-Phenylalanine 各 100 mg/L，L-Leucine、L-Isoleucine 和 L-Valine 各 50 mg/L，以及 L(+)-Selenomethionine 120 mg/L。加入上述胺基酸之後，在 37 °C 下震盪培養 15 ~ 20 分鐘充分混合均勻。最後，加入 1 M Isopropyl- β -D-thiogalactoside (IPTG)

- 2 ml，使 IPTG 的最終濃度為 2 mM，於 37 °C 誘導蛋白質表現 24 小時。
4. 在 4 °C、6000 r.p.m.的條件下離心 20 分鐘，倒去上清液，收集所有的菌體，冰在-20 °C 中保存。
 5. 硒化甲硫胺酸蛋白質之純化，同前面**章節 6-9** 中敘述之蛋白質純化步驟。

6-21-3、晶體培養與鑑定

純化並濃縮後的野生株與硒化甲硫胺酸 LPHase 酵素，分別以懸吊液滴蒸汽擴散法(Hanging-Drop Vapor Diffusion Method)培養蛋白質晶體，其進行晶體篩選的 LPHase 蛋白質濃度為 20~25 mg/ml，此項研究實驗由清大王雯靜老師實驗室合作完成。



6-21-4、蛋白質結構圖形繪製

利用 PyMOL 軟體⁽²⁰¹⁾繪製蛋白質的三級結構圖形、表面示意圖(surface representation)。

6-21-5、蛋白質序列比對與結構分析

於 CAZy 資料庫 (<http://www.cazy.org/>) 中的 Glycoside Hydrolase familyserver 找到 LPHase 蛋白質所屬的醣苷水解酵素第 64 號家族 (Glycoside Hydrolase Family 64)，分別對同屬於醣苷水解酵素第 64 號家族的各不同蛋白質進行序列比對，送入 SDSC Biology WorkBench Version 3.2 (<http://workbench.sdsc.edu/>)的 CLUSTALW 進行多重序列比對(Multiple Sequence

Alignment)，尋找各物種間不同蛋白質是否存在有保守的殘基 (conserved residues)，藉此判斷重要的催化殘基。將蛋白質多重序列比對的結果以及實驗建構之 LPHase 蛋白質三級結構送到 ESPript 2.2 (<http://esprict.ibcp.fr/ESPript/ESPript/>)⁽²⁰²⁾ 預測蛋白質序列具高度相似之二級結構 (secondary structure)，藉此預測的二級結構，協助高序列相似之蛋白質的結構建立與判斷。

6-21-6、三級結構(Tertiary structure)的比對

將 LPHase 蛋白質三級結構送到 Dali Server (<http://www.ebi.ac.uk/dali/>) 進行結構同源性 (structural homology) 的比對，搜尋現有之蛋白質三級結構，找尋 Protein Data Bank 資料庫(<http://www.wwpdb.org/>)中是否存在有類似的蛋白質折疊構型，將 LPHase 結構與找到的類似結構進行三級結構的比較，利用 O version 9.0.7 程式中的 LSQMAN 程式疊置(superimpose)彼此的 C_α 原子⁽²⁰³⁾，藉以定位出 LPHase 蛋白質結構之折疊形式，若無相似的三級結構折疊構型，即可認定此為一全新的(novel)三級結構。

第七章 結果與討論

7-1、 β -1,3-葡聚五糖生產水解醣苷酵素之酵素動力學與重要催化殘基鑑定之研究

7-1-1、 β -1,3-葡聚五糖生產水解酵素之人造基因建構

源自日本研究學者所發現一原核生物 *Streptomyces matensis* DIC-108 所生產之 β -1,3-葡聚五糖生產水解醣苷酵素(LPHase)，其基因(GenBank：AB019428)及蛋白質(GenePept：BAA34349)已發表在NCBI網站(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)，基因的解碼序列(coding sequence, CDS)有1,206個鹼基對(base pair)，可以轉錄轉譯出401個胺基酸。為避免尋求菌種的困難，我們選擇以人造基因的方式來建構重組此酵素。首先，將此酵素之完整基因，分割成 24 段不等的基因片段，並依其設計成寡核苷酸模板引子(見步驟 6-2-2)；同時，為了使LPHase人造基因能表現於大腸桿菌系統中，在所設計的人造寡核苷酸模板引子中，將此蛋白質完整序列前面 35 個胺基酸(MLRTLRRRVTAVALGLATALGGWLAAGVPSAHA)的訊號勝肽(signal peptide)去除。並於設計的兩條人造寡核苷酸模板引子LPHaseH1和LPHaseT1中，分別設計含有Nde I和EcoR I限制酶水解之鹼基序列，以方便未來基因的剪接。

每股人造寡核苷酸模板引子設計約有 60~70 鹼基，每段相鄰的寡核苷酸模板有 11 至 13 個鹼基相互重疊。使用具有 proof-reading 的 *pfu* DNA 聚合酶，來避免複製時產生太多突變點。首先，以中間基因序列設計的寡核苷酸模板引子 LPHaseH12 和 LPHaseT12 進行 PCR 放大反應後，直接以相鄰兩寡核苷酸模板引子 LPHaseH11 和 LPHaseT11 進行下一次 PCR 放大反應，依次進行，並以 DNA 電泳確定放大片段的大小。當進行至第七次，與寡核苷酸模板引子 LPHaseH6 和 LPHaseT6 PCR 放大反應時，發現不論以各種條件方式皆無法放大至所需片段大小。因此，我們將整段目標

基因分成為三段不等的基因片段，並再一次分別於兩人造寡核苷酸模板引子 LPHaseH6 和 LPHaseT6 設計與其相互補之逆股寡核苷酸模板引子。依相同方法先後進行 LPHaseH1 至 LPHaseH6 和 LPHaseT1 至 LPHaseT6 的 PCR 基因合成放大反應，(見圖 7-1-1，lane_BCD)。

當 LPHaseH7 至 LPHaseT7、LPHaseH6 至 LPHaseH1 與 LPHaseT6 至 LPHaseT1 三片段之 PCR 基因放大產物皆完成且確定各片段大小後，將 LPHaseH7 至 LPHaseT7 與 LPHaseH6 至 LPHaseH1 兩放大之 DNA 產物片段，以 *pfu* DNA 聚合酶，利用 PCR 進行放大與連接。由於此兩放大之 DNA 產物片段中，彼此間皆有一小段互補重疊的鹼基序列，並依章節 5-7 所敘述之 DNA 放大連接原理，可將 LPHaseH7 至 LPHaseT7 與 LPHaseH6 至 LPHaseH1 兩 DNA 片段以 PCR 連接成所需之大小。同理，所得放大片段與 LPHaseT6 至 LPHaseT1 之 DNA 片段，再進行最後一次的 PCR 放大連接反應，最後即可得 LPHase 人造基因的全長基因，(見圖 7-1-1，lane_A)。所得全長人造基因，以 *Taq* DNA 聚合酶於 3' 端補上 A 鹼基，再和 yT&A 選殖載體(益生)，以 T4 DNA ligase 進行連接；並作該基因全長序列定序，若有錯誤之鹼基再以定點突變方式進行修補，最後完整序列的 LPHase 人造基因選殖質體，即命名為 T_A-*lphase*。

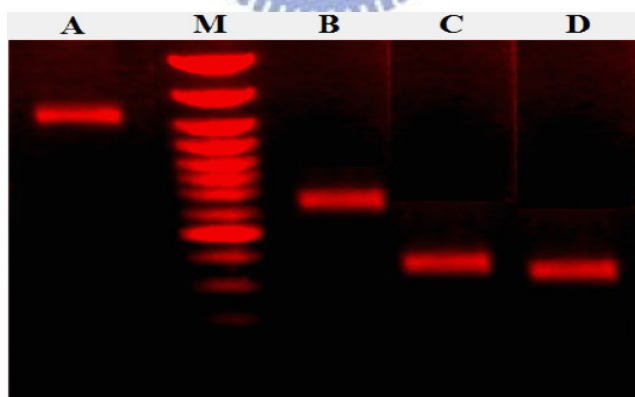


圖 7-1-1、以 PCR 放大所設計之人造基因引子產物。

M：DNA 100 bp marker。

A：LPHaseH1 至 LPHaseT1 之全長人造基因(~ 1,100 bp)。

B：LPHaseH7 至 LPHaseT7 之 PCR 放大產物(~ 590 bp)。

C：LPHaseT6 至 LPHaseT1 之 PCR 放大產物(~ 280 bp)。

D：LPHaseH6 至 LPHaseH1 之 PCR 放大產物(~ 230 bp)。

7-1-2、建構重組 β -1,3-葡聚五糖生產水解醣苷酵素之表現系統

將所建構含人造基因之T_A-*lphase*質體完成基因定序(完整鹼基與胺基酸序列請見附錄XII)。雖然 β -1,3-葡聚五糖生產水解醣苷酵素源自於原核生物*S. matensis* DIC-108中，但為了考慮能於大腸桿菌表現系統中，使用大腸桿菌體內高轉譯頻率之胺基酸來過量表現 β -1,3-葡聚五糖生產水解醣苷酵素。因此，於所設計之人造基因序列中作了靜默突變(silent mutation) (基因序列靜默突變處請見附錄XIII)，即蛋白質序列不因所突變之鹼基而造成胺基酸的改變；蛋白質依然可以執行應有的酵素催化功能，且蛋白質的結構仍維持正常的折疊構形，對於結晶學(Crystallography)的研究而言，蛋白質之晶體結構依然可以提供正確的結構訊息，進行後續的分析工作。

建構人造基因之選殖質體T_A-*lphase*時，已於基因模板引子的設計時，將訊號肽除去，並於成熟酵素蛋白質N端加上一ATG(胺基酸Met)的"開始"轉譯鹼基(見圖7-1-2)；同時，於人造基因兩端設計限制酶可水解之鹼基序列。因此，將建構含有人造基因之選殖質體T_A-*lphase*，以Nde I和EcoR I兩限制酶直接水解後，利用DNA膠回收法收集此人造基因約1,200bp，以T4接合酶和以相同的兩限制酶水解之線性表現載體pRSET_A彼此相接合，後轉殖於大腸桿菌BL21(DE3)菌體中表現蛋白質，見圖7-1-3之示意圖和步驟。

BAA34349	MLRTLRRRVTAVALGLATALGGGWLAAGVPSPAHA AVPATIPLTITNNSGRAEQI
artifice_gene	-----MAVPATIPLTITNNSGRAEQI
BAA34349	HIYNLGTTELSSGRQGWADASGAFHPWPAGGNPPTPAPDASIPGPAPGRSTTIQIP
artifice_gene	HIYNLGTTELSSGRQGWADASGAFHPWPAGGNPPTPAPDASIPGPAPGRSTTIQIP
BAA34349	KFSGRIYFSYGRKMEFRLTTGGLVQPAVQNPTDPNRDILFNWSEYTLNDSGLWIN
artifice_gene	KFSGRIYFSYGRKMEFRLTTGGLVQPAVQNPTDPNRDILFNWSEYTLNDSGLWIN
BAA34349	STQVDMFSAPYTVGVRRGDGTTLSTGKLRPGGYNGVFNALRQSGGWANLIQTRS
artifice_gene	STQVDMFSAPYTVGVRRGDGTTLSTGKLRPGGYNGVFNALRQSGGWANLIQTRS
BAA34349	DGTVLRALSPLYGVETGALPASVMDDYINRVWNKYTGTDLIVTPFADRPDVRTG
artifice_gene	DGTVLRALSPLYGVETGALPASVMDDYINRVWNKYTGTDLIVTPFADRPDVRTG
BAA34349	RVSGGVLRFDTGSGAVVTFQKPDASSVFGCHRLLDAPNDQVRGPI SRTL CAGFN
artifice_gene	RVSGGVLRFDTGSGAVVTFQKPDASSVFGCHRLLDAPNDQVRGPI SRTL CAGFN
BAA34349	RTLLANPHQPDRSAAGFYQEPVTNHYARI IHAHMADGKAYGFAFDDVGHESLV
artifice_gene	RTLLANPHQPDRSAAGFYQEPVTNHYARI IHAHMADGKAYGFAFDDVGHESLV
BAA34349	HDGDPRGASLTLDPF--
artifice_gene	HDGDPRGASLTLDPF--

圖 7-1-2、人造 LPHase 與原生菌種 *S. matensis* DIC-108(NCBI : BAA34349)之蛋白質序列比較。

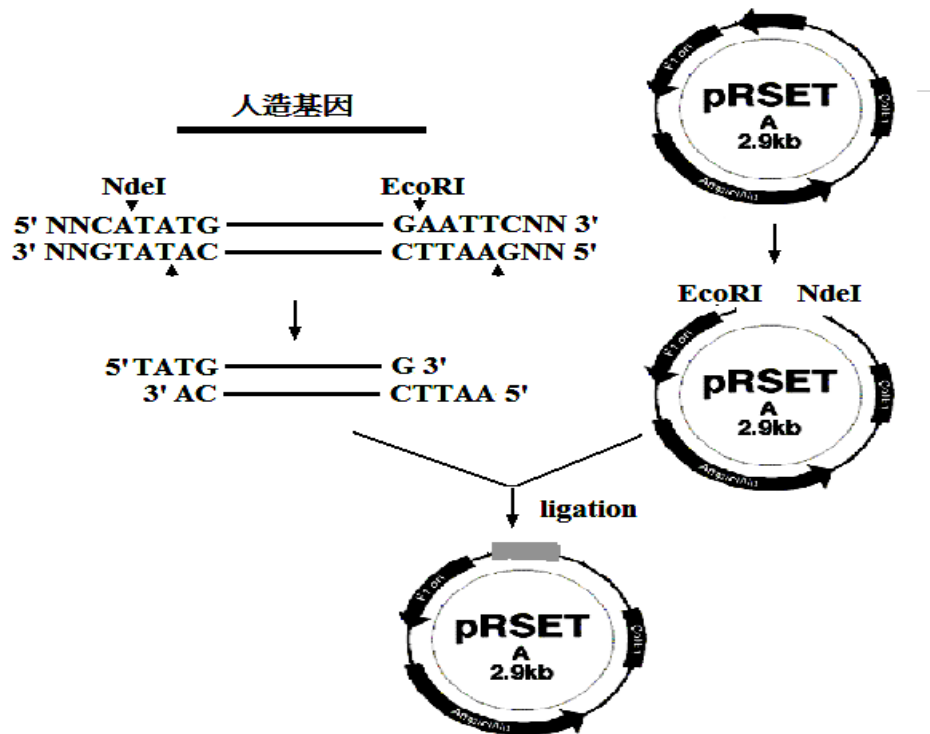


圖 7-1-3、表現載體 pRSET_A 與人造基因 LPHase 剪接步驟示意圖。

7-1-3、重組 β -1,3-葡聚五糖生產水解糖苷酵素的誘導

以 PCR 篩選，確定表現宿主細胞大腸桿菌 BL21(DE3)之 LPHase 基因存在與否後，並以此系統檢視蛋白質的成長與活性曲線。pRSET_A 表現系統主要是藉由 lacZ 的啟動子，以 IPTG 誘導增加蛋白質基因的轉譯，使蛋白質能過量的表現。當菌體的培養誘導過程中，有無加入 IPTG 時，可清楚發現蛋白質(分子量約為 40 kDa)表現的量有明顯的差異，如圖 7-1-6_A 所示之 lane_B 有加入 IPTG 的蛋白質量較 lane_A 無加入 IPTG 的蛋白質量約多 6~8 倍。挑單菌落到 5 mL 的 LBA 培養至 OD₆₀₀ 約 0.5 之後，將其轉到 1L 之 LBA (含 2 mM IPTG)培養基中，培養至 OD₆₀₀ 約 3~4，在培養的過程中隨各時間點定量的取樣，偵測菌體成長密度之 OD₆₀₀ 吸收值；並以超音波震破菌體取其胞內酵素，與 2 %膠狀卡德蘭膠反應 2 小時後，加入等體積 DNS 試劑於 95 °C 中反應，測量 OD₅₄₀ 之吸收值變化，觀察酵素活性的增加，見圖 7-1-4。當培養至 24~30 小時，菌體成長密度與酵素活性皆達至一穩定狀態，將此作為日後酵素誘導之條件。最後，將菌液利用離心機收集菌體，以超音波震破取得胞內粗提液作酵素純化。

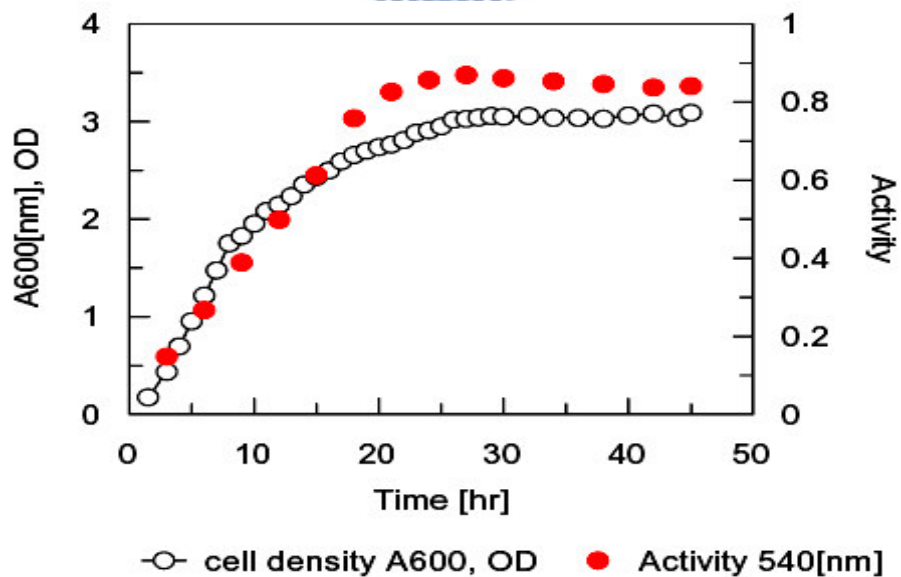


圖 7-1-4、重組蛋白 LPHase 酵素於大腸桿菌 BL21(DE3)的成長表現與活性曲線。

7-1-4、重組 β -1,3-葡聚五糖生產水解糖苷酵素的純化

β -1,3-葡聚五糖生產水解糖苷酵素的純化，包含了野生株及所有的定點突變株酵素，為了避免交叉污染的問題，每一株酵素皆以新的離子層析管柱純化。首先，自含有重組人造基因 LPHase 的大腸桿菌 BL21(DE3) 中，提取新鮮的胞內粗提液。

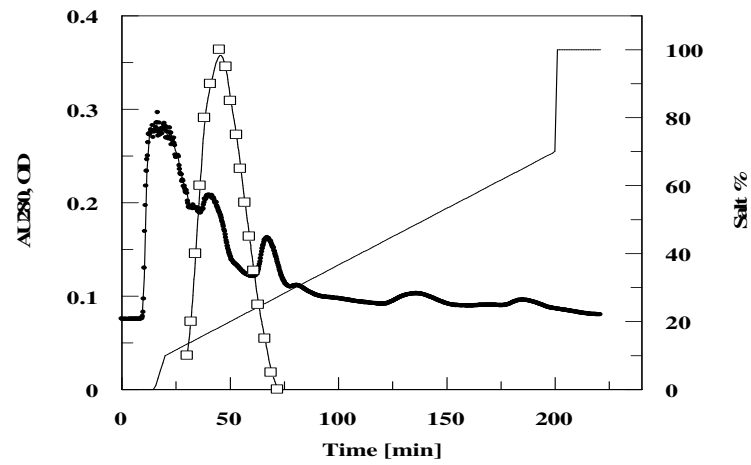
隨後我們以 HiTrap SP 陽離子交換樹脂管柱在 pH 5.8 之醋酸緩衝溶液下來分離酵素。由 HiTrap SP 的層析圖(圖 7-1-5_A)顯示，在 pH 5.8 條件下，此 β -1,3-五糖生產水解糖苷酵素在管柱中會被滯留，而此滯留作用必須以至少 150~250 mM 的氯化鈉濃度才能消除，將蛋白質沖洗下來，收集具有 β -1,3-五糖生產水解糖苷酵素活性的流分；濃縮、除鹽後，以 HiTrap Q 陰離子交換樹脂管柱在 pH 6.8 之磷酸緩衝溶液下進行第二次酵素分離，而酵素活性於鹽類梯度 150~200 mM 的區間被偵測(見圖 7-1-5_B)，收集具有 β -1,3-五糖生產水解糖苷酵素活性的流分；再次濃縮、除鹽後，以 CM 的離子交換樹脂管柱在 pH 5.0 到 pH 7.0 的梯度之下，進行第三次酵素分離，其活性被偵測於 pH 5.2 到 pH 5.7 的區間(見圖 7-1-5_C)，收集具有 β -1,3-五糖生產水解糖苷酵素活性的流分。最後，所得分離酵素經 SDS-PAGE 分析其純度(見圖 7-1-6_B)，顯示其純度已達到 95 % 以上；將此純化的 LPHase 酵素，用於酵素動力學與蛋白質晶體的研究上。

統整全部的純化過程，將純化過程及各純化步驟的純化倍數、回收率制成一純化倍率表，見表 7-1-1 所示。

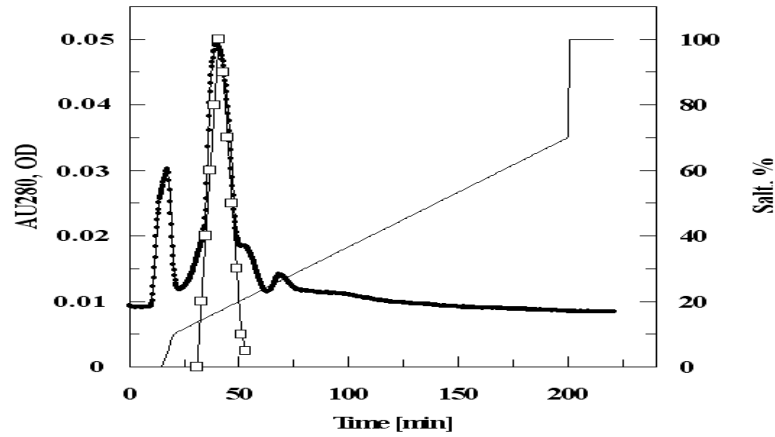
表 7-1-1、重組蛋白質 LPHase 酵素之純化倍率表。

Step	Total Protein (mg)	Total Activity (units)	Specific Activity (units/mg)	Purity Fold	Yield (%)
Crude enzyme solution	195	786	4.1	1	100
HiTrap SP (pH 5.8)	60.8	606	9.9	2.4	77
HiTrap Q (pH 6.8)	13.6	423	31.1	7.6	54
CM column(pH 5.0~7.0)	2.5	266	106.4	25.9	34

(A)



(B)



(C)

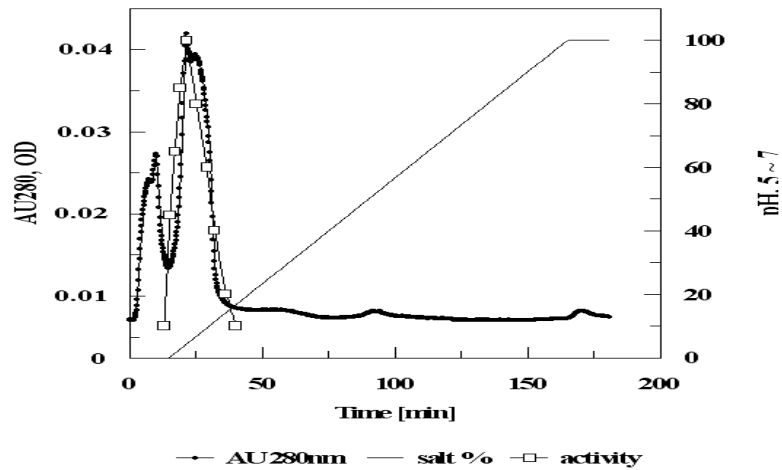


圖 7-1-5、重組蛋白 LPHase 酵素之各純化步驟層析結果圖。

(A) HiTrap SP 陽離子交換樹脂管柱層析 (B) HiTrap Q 陰離子交換樹脂管柱層析

(C) CM Sepharose™ 離子交換樹脂快速層析管柱。

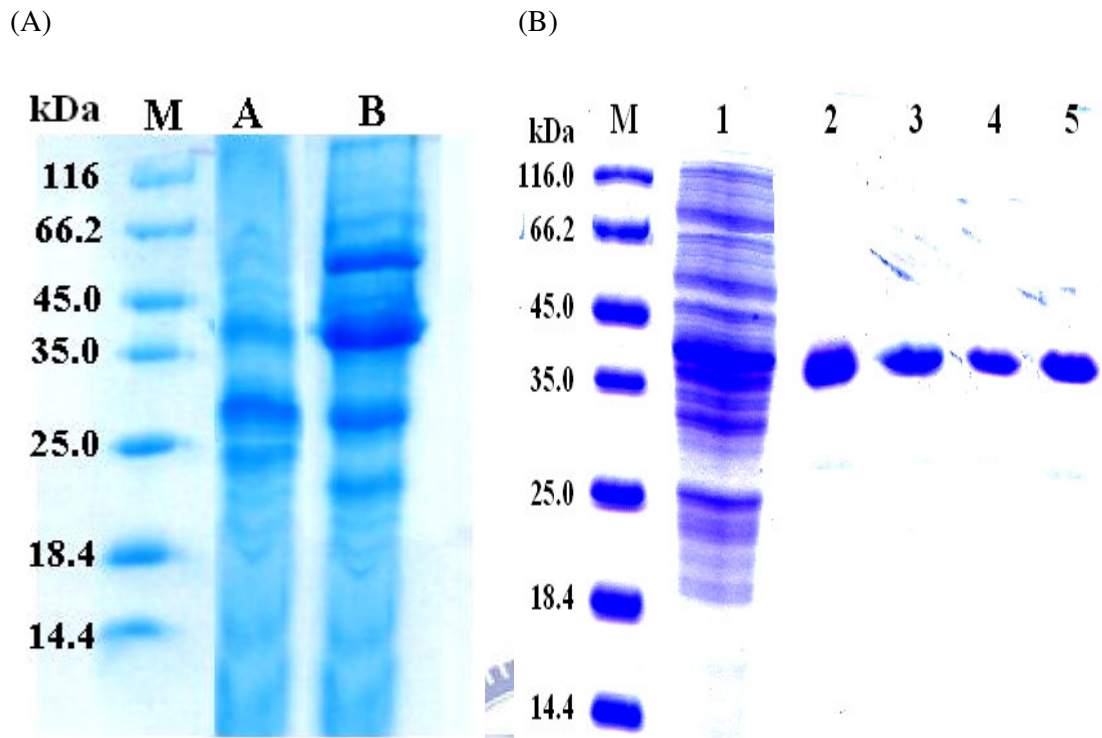


圖 7-1-6、重組蛋白 LPHase 酵素之 SDS-PAGE。

(A) lane M : protein marker (14.4-116 kDa)

lane A : 重組之 LPHase 酵素胞內粗提液(未加 IPTG 誘導)

lane B : 重組之 LPHase 酵素胞內粗提液(加入 IPTG 誘導)

(B) lane M : protein marker (14.4-116 kDa)

lane 1 : 未經過純化之野生株 LPHase 粗提液

lane 2 : 純化過後之野生株 LPHase

lane 3 : 純化過後之突變株 E154G LPHase

lane 4 : 純化過後之突變株 D170G LPHase

lane 5 : 純化過後之突變株 D377G LPHase

7-1-5、重組 β -1,3-葡聚糖生產水解糖苷酵素的性質

7-1-5-1、酵素的分子量

將純化且除鹽之野生株 LPHase 酵素，以 SDS-PAGE 所呈現出酵素分子量約 40 kDa，利用 Q-TOF LC/MS 分析此酵素分子量。由質譜分析可知，主要的蛋白質分子量為 39424 Da (見圖 7-1-7)，而利用 Vector NTI 軟體分析(見表 7-1-2)所得之分子量為 39555.1 Da，兩者之差距約 131.1 Da，其所得數據差值為重組 LPHase 酵素中，第一個轉譯胺基酸-Met 的分子量訊號，推測是蛋白質於表現系統轉譯時，為甲基硫胺基酸蛋白酶所切除。而此現象於本實驗室其他研究亦發生，整體的蛋白質分子量與結構活性無受影響，此純化酵素將被用來作後續的酵素動力學與蛋白質結晶之研究。

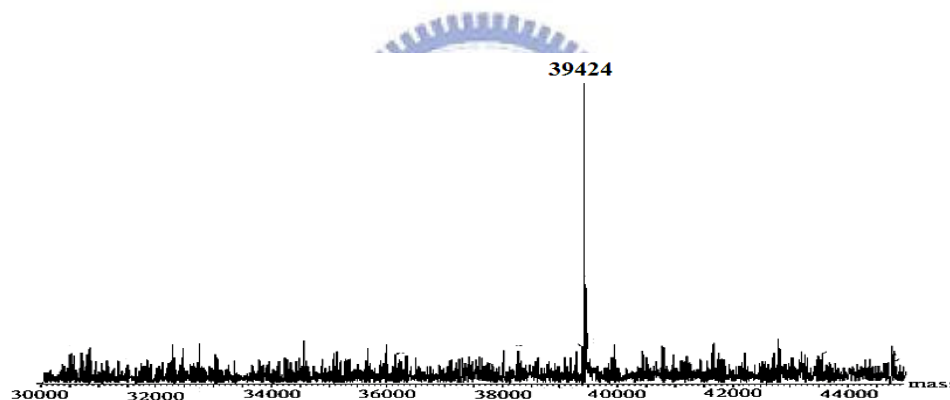


圖 7-1-7、重組蛋白 LPHase 酵素分子量之質譜分析圖。

Analysis	Entire Protein
Length	367 aa
Molecular Weight	39555.08 m.w.
1 microgram =	25.285 pMoles
Molar Extinction coefficient	51020
1 A[280] corr. To	0.78 mg/ml
A[280] of 1 mg/ml	1.29 AU
Isoelectric Point	6.87
Charge at pH 7	-0.36

表 7-1-2、以 Vector NTI 軟體分析重組之 LPHase 酵素分子量和性質

7-1-5-2、蛋白質濃度的決定

蛋白質濃度的決定有很多種方法，常見到的有 Bradford Assay、Lowry Assay、UV 吸光法、BCA Assay 等方法，而精確的蛋白質濃度測定是蛋白質化學中極困難的工作。本實驗使用 Bicinchoninic Acid (BCA) Assay，利用不同濃度的蛋白質標準品對其經 BCA 方法作用之 OD₅₆₂ 吸收值作圖，可得一標準檢量線 ($Y = aX + b$) (請參閱附錄 IV 之圖所示)。將欲預測濃度的 LPHase 野生株和各突變株酵素依相同方法處理，得其 OD₅₆₂ 之值再配合 UV 280 nm 吸收的結果，則可知道 1 OD₂₈₀ 等於多少 $\mu\text{g} / \mu\text{L}$ ，所以往後只要測得 OD₂₈₀ 的值就可以求得各蛋白質的濃度。此部分實驗內容與方法同章節 3-4-2 所描述。

本實驗所用的標準品為 BSA (標準牛血清蛋白)，其濃度為 $1 \mu\text{g} / \mu\text{L}$ ，所預測之 LPHase 蛋白質 ($10 \mu\text{L}$) 經 BCA 測試得 OD₅₆₂ 等於 0.93，代入檢量線換算後得 $2.22 \mu\text{g} / \mu\text{L}$ ，而 OD₂₈₀ 值為 1.53 OD，故可得蛋白質 $1 \text{ OD}_{280} = 1.45 \mu\text{g} / \mu\text{L}$ ，往後所有的蛋白質濃度皆以此為標準。

7-1-6、 β -1,3-葡聚五糖生產水解糖苷酵素之蛋白質催化作用特性

酵素穩定性是動力學研究上的一項主要變因，而影響酵素穩定性有許多，主要是溶液的酸鹼度和反應溫度。若酵素穩定性之變因存在於動力學之數據中，將使該數據難以分析，甚而沒有意義。例如於 pH-profile 之測定上，酵素活性之變化常因 pH 值而改變，而此等活性之變化，常包含結構與酸鹼度之因素。因此，了解酵素的穩定性，進而有效簡化活性變化的變因，才能真正反應出酵素活性與 pH 之關係。以下實驗將就酸鹼度與溫度之因素對酵素穩定度進行研究。

7-1-6-1、酸鹼度對野生株 LPHase 酵素反應活性的影響

為了解酸鹼度對野生株 LPHase 酵素活性的效應，將純化之野生株 LPHase 酵素與與 2 % 膠狀卡德蘭膠受質，置於 37 °C 不同酸鹼值的緩衝溶液反應環境條件下，進行 2 小時水解反應作用。緩衝溶液及其酸鹼值為：Glycine/HCl (50 mM, pH 2、2.5、3)、Citric (50 mM, pH 3.5)、NaOAc (50 mM, pH 4、4.5、5、5.5)、MES (50 mM, pH 5.5、6)、Na₂HPO₄ (50 mM, pH 6.5、7、7.5)、Hepes (50 mM, pH 7.5、8)、Tris (50 mM, pH 8、8.5)、Glycine/NaOH (50 mM, pH 9、9.5、10)、Caps (50 mM, pH 10、10.5)、Na₂HPO₄/NaOH (50 mM, pH 11、11.5)，偵測酵素在各不同 pH 值緩衝溶液之反應活性，見圖 7-1-8 所示。發現重組之野生株 LPHase 酵素最佳的反應活性在 pH 7.5~8.5 的緩衝溶液；當緩衝溶液 pH 值高於 8.5 時，酵素反應活性漸下降，仍可維持 80 % 以上催化活性，而緩衝溶液 pH 值低於 pH 7.0 時，酵素活性亦隨之下降。利用 LC/MS 偵測分析，在各不同 pH 緩衝溶液中，膠狀卡德蘭膠與酵素反應水解之產物，發現產物皆為 β-1,3-葡聚五糖。

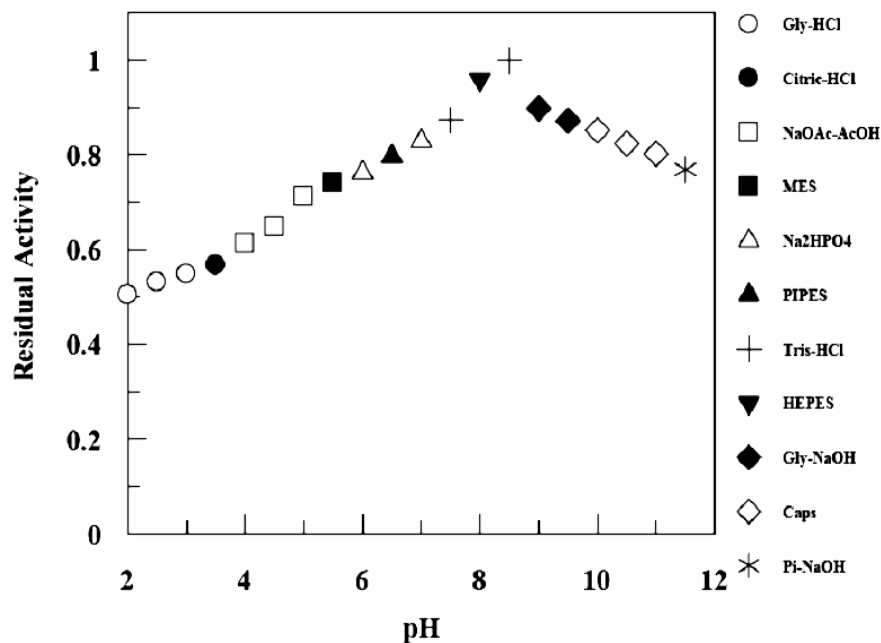


圖 7-1-8、酸鹼度對野生株 LPHase 酵素反應活性的影響。

7-1-6-2、酸鹼度對野生株 LPHase 酵素穩定性的影響

圖 7-1-9 為純化之野生株 LPHase 酵素在 25 °C 下，於不同酸鹼溶液中存放，然後隨各存放時間點，定量取出於同一個適當 pH 值的磷酸緩衝溶液(50 mM, pH 7.5) 下，與 2 % 受質膠狀卡德蘭膠，在 37 °C 下水解反應 2 小時後，所測得的活性殘餘活性比例變化圖。殘餘活性比例(residual activity ratio)的定義是以 25 °C，酵素存放於 pH 7.0 緩衝溶液的第一個時間點為參考值而得。由圖 7-1-9 可看出在 25 °C 時，4 小時之內，從 pH 5.0 到 pH 9.0 之間酵素可以維持 90 % 以上的穩定度，而於 pH 4.0 和 pH 9.0 到 pH 10.0 之間酵素仍可維持 65 %~75 % 之間的穩定度，但當低於 pH 3.0 以下，酵素活性急遽下降。可推測 β -1,3-五糖生產水解糖苷酵素，偏屬於一嗜鹼性的蛋白質，於高 pH 值的溶液仍呈現一較佳的結構與反應活性。此說明了易溶於高 pH 值鹼性溶液的卡德蘭膠，與同存於高 pH 值鹼性溶液中的 β -1,3-五糖生產水解糖苷酵素，彼此仍有不錯的酵素催化反應活性。

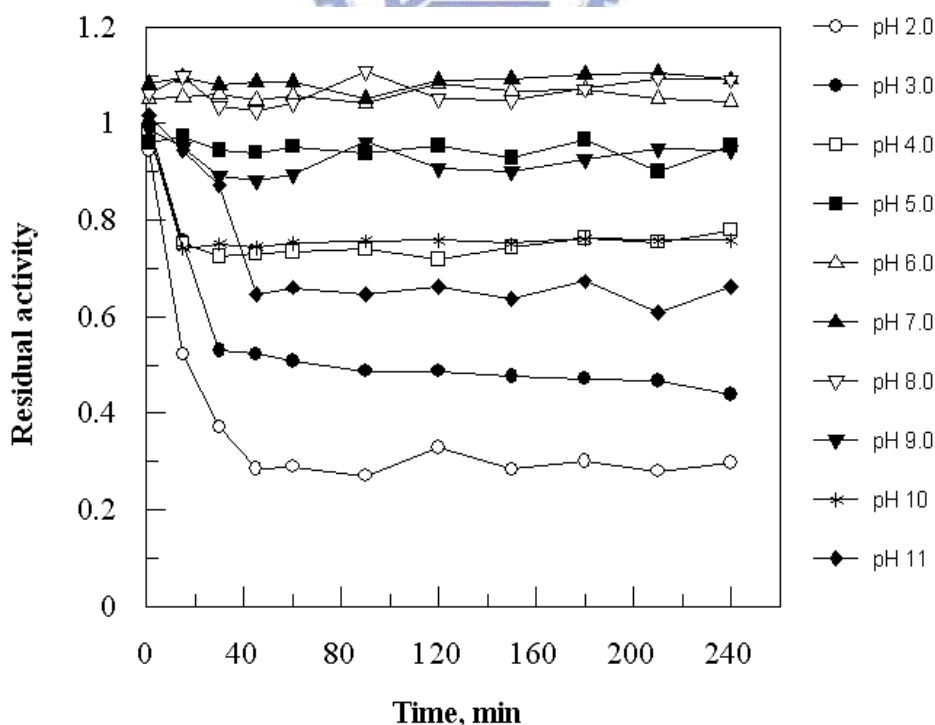


圖 7-1-9、在 25 °C 中，酸鹼度對野生株 LPHase 酵素穩定性的影響。

7-1-6-3、溫度對 β -1,3-葡聚五糖生產水解糖苷酵素活性的影響

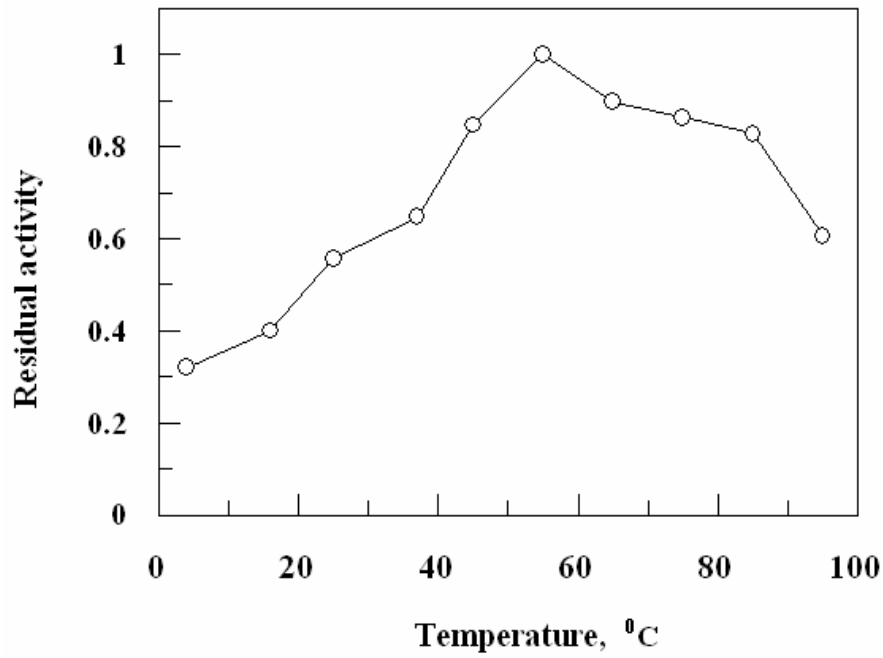
對酵素反應活性測量，會隨著不同溫度改變下，影響酵素催化的結果。為了解此效應，取純化之野生株 LPHase 酵素分別置於 4 °C、16 °C、25 °C、37 °C、45 °C、55 °C、65 °C、75 °C、85 °C 和 95 °C 等不同溫度的 50 mM 磷酸緩衝溶液(pH 7.5)下，與 2 % 膠狀卡德蘭膠受質進行 2 小時水解反應，所得反應速率與溫度關係，見圖 7-1-10_A 所示。由該圖可以看出當逐漸升高反應溫度時，可發現野生株 LPHase 酵素反應催化活性也隨之上升；但是當反應溫度升高至溫度 55 °C 以上時，酵素在反應時間之內的催化活性逐漸遞減。可知在超過 55 °C 以上的反應溫度下，酵素的結構與催化反應被受破壞或影響，進而降低其催化活性。該圖所用之野生株 LPHase 酵素催化水解膠狀卡德蘭膠的活性參考點，設其值為 1。



7-1-6-4、 β -1,3-葡聚五糖生產水解糖苷酵素的熱穩定性

圖 7-1-10_B 顯示為野生株 LPHase 酵素存放於不同溫度 25 °C ~ 75 °C 的期間，酵素催化活性穩定度的比較。而殘餘活性比例的定義是以 2 % 膠狀卡德蘭膠為反應受質，在 37 °C、50 mM 磷酸緩衝溶液(pH 7.5)下，與存放於 4 °C 之純化野生株 LPHase 酵素進行 2 小時水解作用，以此為反應活性參考點。隨後觀測純化野生株 LPHase 酵素存放在不同溫度中，相同反應環境條件下，於各存放時間點所得的催化反應活性，再除以參考點活性的殘餘比例，由該圖可知，當野生株 LPHase 酵素存放於不同溫度 4 小時之內，在溫度 25 °C ~ 60 °C 之間活性並不會隨著溫度的改變而有明顯的變化，其酵素的穩定度相當好。但當野生株 LPHase 酵素存放溫度高於 65 °C 以上時，酵素催化活性則隨著存放時間的增加而有降低之趨勢，表示溫度高於 65 °C 以上已使酵素結構變的不穩定，進而降低催化作用之活性，使酵素無法維持正常之穩定性。

(A)



(B)

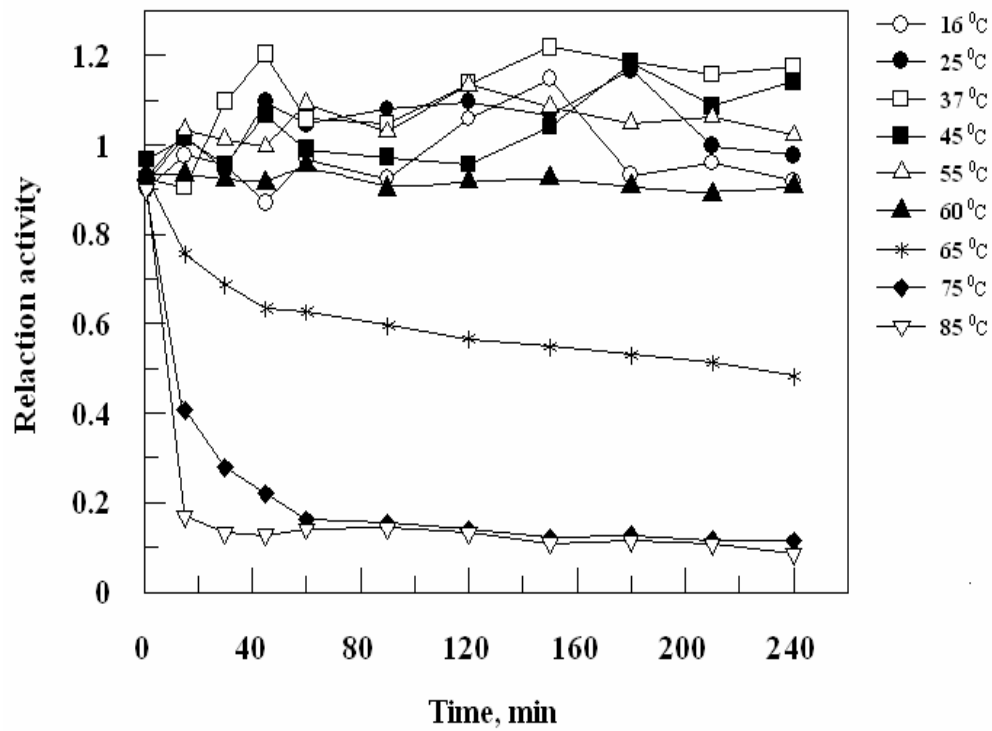


圖 7-1-10、溫度對野生株 LPHase 酵素反應活性與穩定度的影響。

(A) 不同溫度對酵素催化活性的影響。

(B) 酵素存放不同溫度下對穩定度的影響。

7-1-6-5、金屬離子及試劑對野生株 LPHase 催化活性的影響

一般的酵素在活性中心(active site)處可能會有一個至多個金屬離子，這些金屬離子可在酵素催化反應中，利用配位鍵結的方式幫助酵素作用，使受質與酵素分子更容易進行反應，此類酵素稱作 metalloenzyme。

若酵素是 metalloenzyme，且其金屬離子並非共價性鍵結於酵素中，當在純化酵素的過程中，金屬離子可能被釋放出，而影響酵素之活性，因此，當於反應的緩衝液中，加入適量濃度之金屬離子，有助於恢復酵素之催化活性。在 37 °C 下，將已純化之野生株 LPHase 酵素與 2 % 膠狀卡德蘭膠，置於含 2 mM 各金屬離子之反應緩衝溶液中，分析其水解還原糖量的活性變化。由表 7-1-3 的相對活性觀測金屬離子對酵素作用影響，發現二價鹼金族離子會略增強 LPHase 酵素之活性，其它過渡金屬離子除了 Hg²⁺ 離子，酵素的催化活性都在 90 % 以上。重金屬 Hg²⁺ 離子、DTT 和還原試劑 2-mercaptoethanol 等，對於 LPHase 酵素則有完全的抑制作用，推測是與酵素中自由的 Cys 胺基酸之硫鍵結作用，破壞酵素結構，使得酵素失去原有催化作用。

表 7-1-3、金屬離子及試劑對野生株 LPHase 酵素活性的影響。

金屬離子	相對活性 % *	金屬離子	相對活性 % *
None	100 %	Mn ²⁺	89 %
Cu ²⁺	94 %	Ca ²⁺	99 %
Cd ²⁺	97 %	Mg ²⁺	101 %
Ni ²⁺	92 %	Fe ²⁺	93 %
Ba ²⁺	102 %	EDTA	91 %
Zn ²⁺	90 %	DTT	5 %
Hg ²⁺	8 %	2-mercaptoethanol	1 %
Co ²⁺	98 %		

* LPHase 酵素與含 2 mM 各金屬離子和試劑之膠狀卡德蘭膠作用 2 小時後，在 DNS 試劑標準反應系統下，偵測在 OD₅₄₀ 的吸收值，換算與不含金屬離子之相對活性。

7-1-6-6、 β -1,3-葡聚五糖生產水解糖苷酵素對受質作用之特異性 (substrate specificity)

根據以往的研究， β -1,3-葡聚五糖生產水解糖苷酵素具有對受質專一的特異性。我們將純化之野生株 LPHase 酵素測試水解下列各不同糖苷分子組成和不同結構的長鏈聚糖之催化活性：curdlan (卡德蘭膠，完全 β -1,3-葡萄糖)、laminarin (來自 *Laminaria digitate*； β -1,3/1,6-葡萄糖，每 25 個 β -1,3-葡萄糖苷分子鏈單位內含 1~3 個 β -1,6-葡萄糖的分支)、lichenan (地衣多糖，來自 barley； β -1,3/1,4-葡萄糖，每 3 或 4 個糖苷分子鏈單位內含 1 個 β -1,3-糖苷鍵)、xylan (木質聚糖， β -1,4-木質糖)、cellulose (纖維素， β -1,4-葡萄糖)、starch (澱粉， α -1,4-葡萄糖)、chitin (β -1,4-乙醯葡萄糖胺)、chitosan (β -1,4-葡萄糖胺)、Lentinan (來自 *Lentinus eeodes*； β -1,3/1,6-葡萄糖，每 5 個 β -1,3-葡萄糖苷分子鏈單位內含 2 個 β -1,6-葡萄糖分支)、Schizophyllan (來自 *Schizophyllum commune*； β -1,3/1,6-葡萄糖，每 3 個 β -1,3-葡萄糖苷分子鏈單位內含 1 個 β -1,6-葡萄糖分支)、Pachyman (來自 *Poria cocos*； β -1,3/1,6-葡萄糖，每單位 β -1,3-葡萄糖苷分子鏈內含數個 β -1,6-葡萄糖分支)、Soluble β -glucan (來自 *Saccharomyces cerevisiae*；水溶性 β -1,3/1,6-葡萄糖，每單位 β -1,3-葡萄糖苷分子鏈內含數個 β -1,6-葡萄糖分支)，在 37 °C 下，pH 7.5 反應溶液之標準水解作用系統下，以 DNS 試劑偵測酵素反應的還原糖生成量，進而求得各相對活性比，見表 7-1-4。可知此野生株 LPHase 酵素，對主幹為完全 β -1,3-鍵結的葡萄糖有極高的專一性水解作用，但對非葡萄糖分子組成或以其它不同結構方式鍵結的長鏈聚糖則完成幾乎無催化水解活性。另外，於眾多長鏈聚糖之中，含有 β -1,6-分支結構鍵結的 β -1,3-葡聚糖，則 LPHase 酵素對其水解催化的活性也相對的低，僅只對主幹含有較長 β -1,3-葡萄糖苷分子鏈的 laminarin 有 ~60 % 的相對水解活性。隨後將具活性的反應作用，以液相-電噴灑質譜儀 (LC/ESI-MS) 進行偵測分析，為 $m/z = 851.2$ 之 β -1,3-葡聚五糖產物，見圖 7-1-11 所示。推測這些含較多 β -1,6 鍵結分支結構的 β -1,3-葡聚糖，降低糖苷受質於酵素之催化中心的鍵結引力，而無法催化降解主幹少於五個 β -1,3-葡萄糖苷鍵的 β -1,3/1,6-葡聚糖。

表 7-1-4、野生株 LPHase 酵素和各不同糖苷分子、結構的長鏈聚糖之相對反應活性^a。

長鏈聚糖	鍵結結構	相對活性(%)	長鏈聚糖	鍵結結構	相對活性(%)
Curdlan	Glc(β-1,3)	100	Chitin	GlcNAc(β-1,4)	~ 0
Laminarin	Glc(β-1,3/1,6)	~ 60	Chitosan	2-NH ₂ Glc(β-1,4)	~ 0
Lichenan	Glc(β-1,4/1,3)	~ 0	Lentinan	Glc(β-1,3/1,6)	~ 10
Xylan	Xyl(β-1,4)	~ 0	Schizophyllan	Glc(β-1,3/1,6)	~ 3
Cellulose	Glc(β-1,4)	~ 0	Pachyman	Glc(β-1,3/1,6)	~ 5
Starch	Glc(α-1,4)	~ 0	Soluble β-glucan	Glc(β-1,3/1,6)	~ 9

a. 野生株和以 50 mM 磷酸緩衝溶液(pH 7.5)所配製之 2 % 各不同長鏈聚糖($M_w \sim 1.6 \times 10^4 - 2.0 \times 10^6$)，於 37 °C 下，作用 2 小時後，再以 DNS 試劑標準反應系統下，偵測在 OD₅₄₀ 的吸收值，再換算其相對反應活性比。

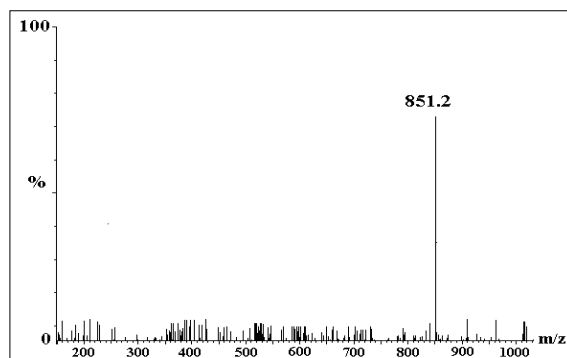


圖 7-1-11、以 LC/ESI-MS 分析，LPHase 酵素和卡德蘭膠反應後之水解產物。

7-1-7、 β -1,3-葡聚五糖生產水解糖苷酵素之水解反應產物分析

對眾多家族中之 β -1,3-葡聚糖水水解糖苷酵素而言，依該酵素所水解反應的產物，更可將其細分為內切型(endo-type)或外切型(exo-type)兩種不同催化結構性質的糖苷水解酵素，其中以外切型(exo-type)的催化結構酵素，能水解而獲取極高專一性的單一成份寡糖；以本研究之家族 GH-64 的 *S. matensis* DIC-108 所分泌，以水解直鏈 β -1,3 鍵結葡聚多糖生產高專一性 β -1,3-葡聚五糖之 β -1,3-葡聚五糖生產水解糖苷酵素為特別。檢視在同家族 GH-64 中，與 *Oerskovia xanthineolytica* 和 *Arthrobacter sp.YCWD3* 兩株菌種所分泌之 β -1,3-葡聚糖水水解糖苷酵素的各基因型態，皆歸屬一內切型(endo-type)水解酵素(EC 3.2.1.39)，不同的是水解產物分析上，卻為二至十個糖苷分子鏈不等的混合 β -1,3-葡聚寡糖。在未能窺探各酵素彼此蛋白晶體結構上的差異，對活性催化區域的蛋白序列比對分析上，卻有極高的相似度(~ 70%)。我們利用純化之野生株 LPHase 酵素對直鏈膠狀卡德蘭膠，於 20 mM 磷酸緩衝溶液(pH 7.5)的標準反應系統下，進行水解反應。隨各不同作用反應的時間點，以液相-電噴灑質譜儀作即時偵測分析，見圖 7-1-12_A 所示。可清楚發現該 LPHase 酵素在催化水解的初始反應上，只有單一 β -1,3-葡聚五糖(β -1,3-laminaripentaose, $[M-Na^+]^+$, $m/z = 851.2$) 之產物偵測訊號。從 LPHase 酵素初步反應可得如此高專一性水解產物之結果，初步推測該酵素的初始催化反應的確為外切(exo-type)型水解作用模式。但隨作用時間的增長，不免於反應產物的質譜圖中，分析到 β -1,3-葡聚二、三、四糖等寡糖分子量。同時，以 HPLC 作各不同反應時間點的產物分離與定量分析，並計算各分離吸收峰下的積分面積(即代表產物之生成量)，確實為 β -1,3-葡聚三、四寡糖且積分值隨酵素作用時間增長而增加，見圖 7-1-12_B 所示。探究可能之原因，可能為：膠狀卡德蘭膠是一高分子糖苷長直鏈，長度和分子量呈現混合不等的似高斯分布區線，在與 LPHase 酵素初始的水解作用下，產物雖為 β -1,3-葡聚五糖，但隨糖苷鏈的水解反應至末端時，無法再與酵素作用而產生的。另一為：當酵素水解作用時間的增長，反應產物 β -1,3-

葡聚五糖之生成量亦隨之增加；此時，水解產物對 LPHase 酵素發生了迴饋催化反應，即 β -1,3-葡聚五糖取代長鏈卡德蘭膠受質，進入催化活性中心而再次與酵素發生水解作用。這些現象，推測與該 LPHase 酵素之蛋白結構，或糖苷受質對酵素催化中心之結合次單位區域的鍵結作用特徵、模式(substrate binding characters)有關。

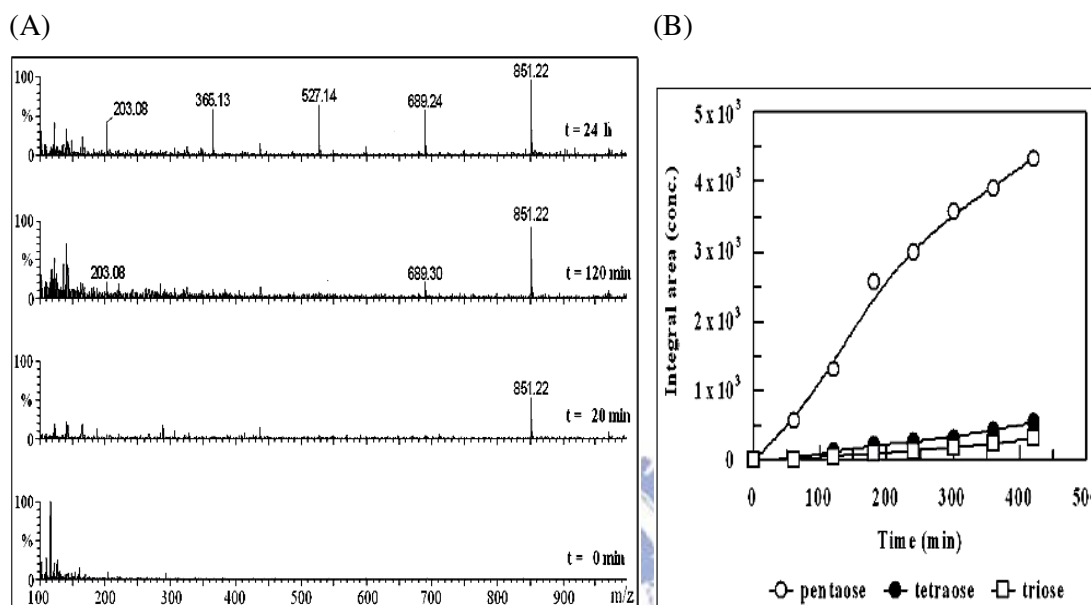


圖 7-1-12、以 LC/MS 和 HPLC 分析，LPHase 酵素與卡德蘭膠在各不同時間點之反應產物和生成量。

(A) 在與酵素各不同反應時間點，以 LC/MS 所作之產物分析， β -1,3-laminari-pentaose/tetraose/triose/biose($[M-Na^+]^+$, $m/z = 851.2/689.3/527.1/365.1$)。(B) 以 HPLC 定量分析，在各不同反應時間點的產物生成量之變化。

為了探究上述所推測之因素，我們利用具修飾化的單一組成寡糖與野生株 LPHase 酵素進行 time-course 的水解反應，並配合液相-電噴灑質譜儀所作的即時偵測，以觀察判斷本實驗 LPHase 酵素之確切水解和結合次單位區域的鍵結模式。首先，分別將 β -1,3-葡聚六糖 (β -1,3-laminarihexaose) 和 β -1,3-葡聚七糖 (β -1,3-laminariheptaose)，置於無水甲醇溶液中，並加入 0.1 eq 之 2 N 鹽酸反應，至兩寡糖形成還原端具甲基修飾化的產物，並以液相-電噴灑質譜儀鑑定分析，兩甲基化寡糖之分子量分別為： $1-O$ -methyl- β -1,3-laminarihexaose($[M-Na^+]^+$, $m/z = 1027.2$)和

1-*O*-methyl- β -1,3-laminariheptaose($[M-Na^+]^+$, $m/z = 1189.1$)。隨後以磷酸緩衝液 (20 mM, pH 7.5), 將兩具甲基修飾化的寡糖產物, 分別配製成 10 mM 的反應受質溶液, 與野生株 LPHase 酵素在 37 °C 下進行反應, 針對在各不同作用時間點以液相-電噴灑質譜儀作即時偵測, 結果顯示於圖 7-1-13。實驗的過程中, 發現 LPHase 酵素對短鏈寡糖之催化反應速率不如長鏈卡德蘭膠強烈, 但在長時間之質譜追蹤圖中可清楚顯示, 兩甲基修飾化的寡糖在酵素的催化水解作用下, 初始反應產物皆為甲基修飾化的 β -1,3-葡聚五糖(1-*O*-methyl- β -1,3-laminaripentaose, $[M-Na^+]^+$, $m/z = 865.3$)產物, 但隨著和 LPHase 酵素作用時間的增加, 催化反應的專一性也隨之降低, 各不同結構、分子量的混合寡糖皆產生(質譜圖中, 各分子量之結構可由圖 7-1-14 來相互對照)。推斷 LPHase 酵素之催化中心, 含五個糖苷分子的鍵結結合次單位區域, 且由糖苷受質之還原端一方進入活性中心, 在酵素的兩重要催化殘基作用下, 開始往糖苷非還原端一方進行水解反應, 產生專一 β -1,3-葡聚五糖。同時, 亦可能因酵素催化中心的糖苷受質結合次單位區域如此之大, 使在酵素反應作用期間, β -1,3-葡聚五糖產物的生成量亦隨之增加, 因受酵素活性中心內周圍...等胺基酸氫鍵吸引作用力之影響, 不規則的鍵結於此結合次單位區域中, 而繼續進行催化、水解反應, 致使產生結構 $\leq \beta$ -1,3-葡聚五糖的各短鏈寡糖分子。此結果與清大王雯靜老師所合作, 利用鑑定 LPHase 酵素的複合晶體結構, 探討酵素對糖苷受質之鍵結水解模式, 亦彼此相互呼應。

由於家族 GH-64 之 LPHase 酵素能催化水解長鏈卡德蘭膠, 產生高專一性 β -1,3-葡聚五糖之產物, 有一想法, 利用其水解之產物, 自行合成一帶有 UV 吸收之芳香族官能基-對硝基苯的 β -1,3-葡聚五糖糖基化合物, 作為偵測 LPHase 酵素動力學催化反應速率的糖苷受質。當以液相-電噴灑質譜儀進行, 合成之糖基受質 *p*-NLPG 與 LPHase 酵素水解反應的產物分析, 亦有所作用。因此, 我們將以 UV 吸收光譜準確分析 LPHase 酵素對作用受質的水解反應速率(k_{cat} 、 k_{cat}/K_m)值。同時, 鑑定 LPHase 酵素催化機制與兩重要催化殘基之判定。

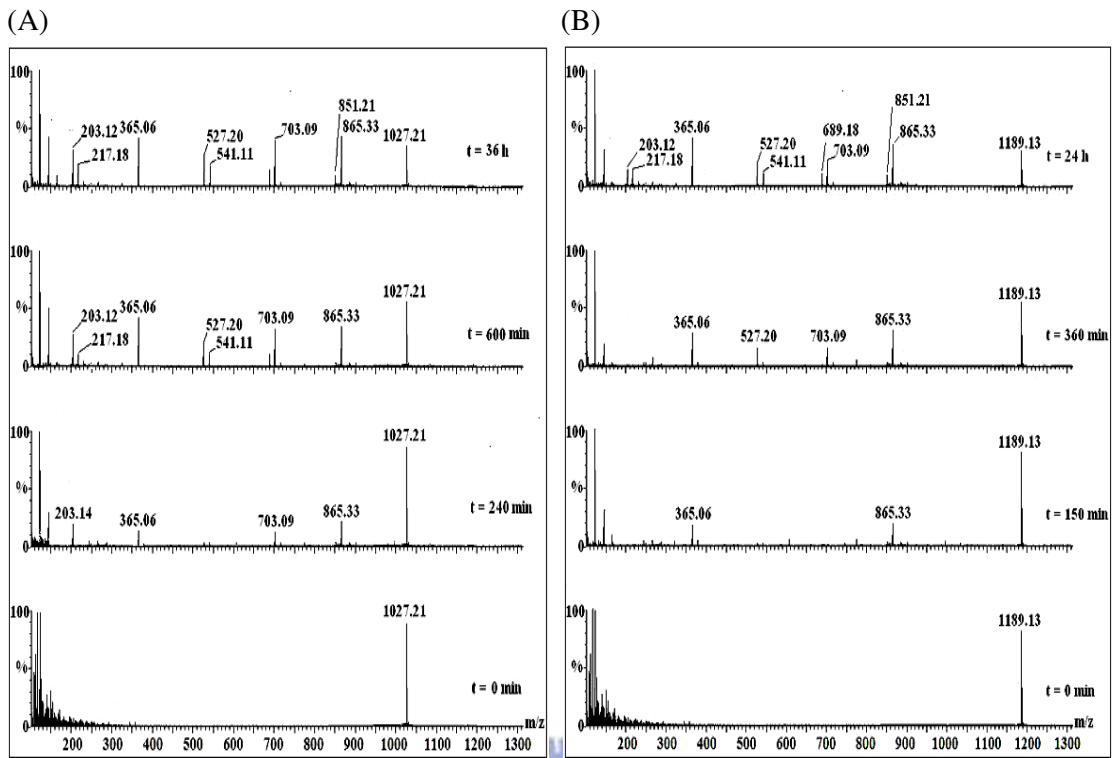


圖 7-1-13、甲基修飾化糖苷受質 1-O-methyl-β-1,3-laminarihexose(和-laminariheptaose)

分別與野生株 LPHase 酵素，在各不同反應時間點之 LC/MS 產物分析圖。

(A) 1-O-methyl-β-1,3-laminarihexose 和 (B) 1-O-methyl-β-1,3-laminariheptaose，皆為還原端具甲基化修飾之單一 β-1,3 寡糖受質，分別和 LPHase 酵素在不同時間反應後，以液相-電噴灑質譜儀分析各水解產物之變化。

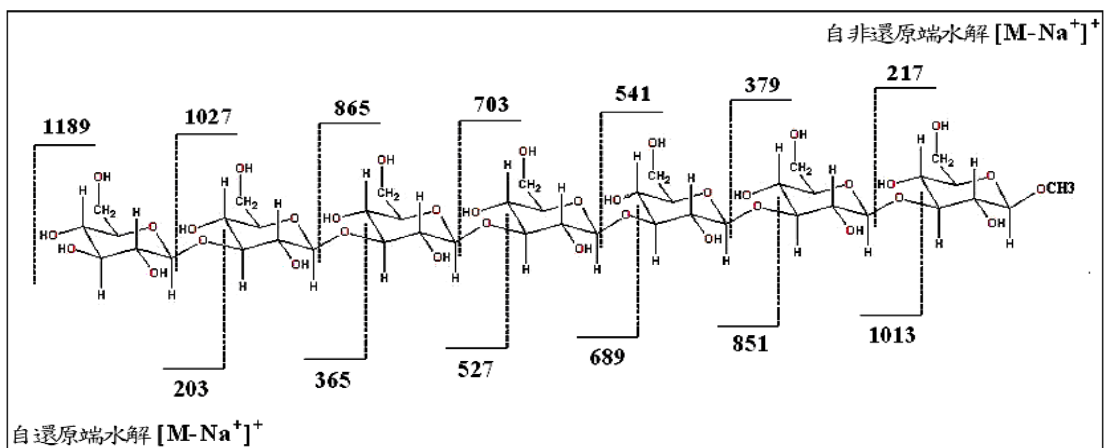


圖 7-1-14、糖苷 1-O-methyl-β-1,3-laminariheptaose 在各不同鍵結位置所斷裂之分子量。

以此圖說明上圖 7-1-13 之糖苷受質反應後的產物分析，於質譜圖中，所代表的各吸收峰值的糖苷分子。

7-1-8、酵素法製備 β -1,3-葡聚五糖(Laminaripentaose)

由前序述糖苷水解酵素家族 GH-64 之 LPHase 酵素，雖歸類於 EC 3.2.1.39 之內切型結構水解蛋白質，但對長鏈 β -1,3-葡聚多糖的水解作用卻可得專一性的 β -1,3-葡聚五糖產物。由於 β -1,3-葡聚五糖產物的生產來源與製造方法複雜且不易取得，因此在商業用途上有其特定價值。我們以重組的 LPHase 酵素，利用酵素工程技術來大量製備生產 β -1,3-葡聚五糖。首先，以蛋白質和分子生物工程技術，取得高濃度與高純度的 LPHase 酵素；隨後將此酵素與自製的卡德蘭膠置於膜孔洞大小 $< 3,000$ 的透析膜中進行水解反應，利用透析和分離 β -1,3-葡聚五糖與未反應之卡德蘭膠的效果，進而提高 β -1,3-葡聚五糖產物的純度與生產率。詳細生產製備步驟與方法請參閱 章節 6-12 之內容。若以自製之 3 克卡德蘭膠進行水解反應，可得約 2.3 克的 β -1,3-葡聚五糖產物，水解產率在 70~80 % 以上。

7-1-9、芳香族官能基- β -D-1,3-葡聚五糖苷化合物受質的合成

為了研究酵素水解的反應機構，以合成一具 UV 光譜吸收偵測的芳香族官能基載色體之糖基化合物受質(substrate)。因此，利用自製的 β -D-1,3-葡聚五糖設計合成。合成策略如下：

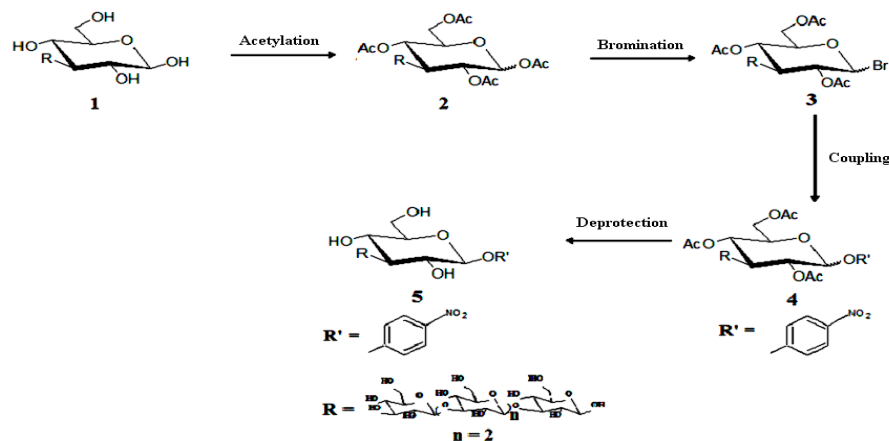


圖 7-1-15、糖苷受質合成策略示意圖。

在合成芳香族官能基受質，以採用圖 7-1-15 之合成策略，先由自備之 β -1,3-葡聚五糖將糖分子上-OH 基團進行保護，然後溴化再進行耦合(coupling)，最後去保護基。首先，將 β -1,3-葡聚五糖以醋酸酐/吡啶，將-OH 基團進行保護，此步驟可獲得 88 % 的高產率。接下進行溴化反應使糖基一號碳(C1)接上一強離去基-溴分子，以便進行下一步之耦合反應。由於溴化之化合物極不穩定，不可久放，反應完要立即進行下一步驟之化學反應。

由於芳香族在不同位置之取代基有著不同 pKa 的解離能力，因此在耦合(coupling) 反應上也必須依據 pKa 的不同而選擇，進行反應的條件為：當 pKa 大於 8 之芳香族，利用 KOH 形成 phenolate 再進行耦合；而 pKa 小於 8 之芳香族(如：4-nitrophenol)，則使用 DIPAE 有機鹼和 phenol 直接進行反應。在耦合反應中，C1-Br 為一好的離去基，而和形成 phenolate 之芳香族，進行親核性鍵結反應，產生 α/β 兩種型式的芳香糖基受質，其可利用有機合成上 dynamic control 和 kinetic control 之理論藉以控制耦合反應，提高所需化合物型式之產率。本實驗之受質為 β -form 之對硝基苯- β -1,3-葡聚五糖，為 C1、C2-trans 的構形之穩定形成化合物，控制溫度由 0 °C 慢慢升至 25 °C 的反應環境，可得產率 75 % 的 β -form 產物。最後，以鹼性條件下，以無水 MeOH/NaOMe 進行去保護，在反應期間，可發現有懸浮化合物析出，此即為糖基受質產物，在懸浮化合物不再析出時終止反應，過濾、抽乾，即最終動力學反應之糖苷受質：*p*-NLPG。

反應受質 *p*-nitrophenyl- β -1,3-Laminaripentaose 糖苷化合物之 $^1\text{H-NMR}$ 光譜請參閱附錄 XIV。

***p*-nitrophenyl- β -1,3-Laminaripentaose (*p*-NLPG)** : 8.19 (d, $J = 9.2$ Hz 1H, ArH), 7.17 (d, $J = 9.3$ Hz 1H, ArH), 5.81(d, $J = 7.5$ Hz, 1H, H-1), 3.77-3.79 (H-3), 3.74 (H-6), 3.56-3.57 (H-2), 3.52-3.53 (H-4), 3.51 (H-5), (D_2O , 300 MHz)。反應受質之分子式： $\text{C}_{36}\text{H}_{55}\text{NO}_{28}$ ，ESI⁺偵測分析[M-Na⁺]⁺: 972.18。

7-1-10、鑑定 LPHase 酵素之重要催化殘基位置的研究方法

根據目前文獻研究報告，有關於反轉催化機制的 β -1,3-葡聚糖水解糖苷酵素家族 GH-55、GH-64、GH-81 之重要催化殘基與位置尚不完整。糖苷水解酵素之家族 64 號(Glycoside Hydrolase Family 64 / family GH-64)之 LPHase 為一內切型(endo-type)的反轉催化機制，以水解 β -1,3 糖苷鍵結之長鏈 β -葡聚多糖，而產生高專一性 β -1,3-葡聚五糖之糖苷水解酵素；對此家族至今亦尚無任何有關催化重要殘基的文獻報導。因此，鑑定該 LPHase 酵素在催化反應中，何者胺基酸扮演一般鹼性(或親核基)與扮演一般酸性重要催化基團，將是本論文所要深入探討的重要待解課題。

對單取代-反轉催化構形的 LPHase 酵素，似 S_N2 催化機制，與其他相同機制的糖苷水解酵素在反應作用之功能研究上，酵素的活性中心裡至少有兩個重要催化胺基酸(essential amino acid)參與反應，分別為扮演一般鹼催化殘基，使水分子產生極化作用，對糖分子的一號碳(C1)進行親核性攻擊，同時，由扮演一般酸催化殘基使糖苷氧基發生質子化(protonation)時亦伴隨著配糖基(aglycone)的離開，故受質糖-酵素無鍵結之中間體形成，一旦失去或突變對整個酵素催化活性必造成嚴重影響。至今尚無任何該酵素的完整蛋白-糖苷受質複合晶體結構，可提供最直接的鑑定證據。因此，我們將採行以最古典的酵素學研究方法---基因定點突變，觀測何者突變點對酵素催化活性上有明顯改變，來解開 LPHase 酵素催化作用之重要殘基。首先，在糖苷水解酵素家族 GH-64 中，檢視出酵素完整的序列中，可能為催化作用殘基之酸性胺基酸 Aspartic acid (Asp/D)或 Glutamic acid (Glu/E)的位置。因此，由基因庫(genbank)的檢視得知，糖苷水解酵素家族 GH-64 之中，已有二十多種來自細菌與真菌的 β -1,3-葡聚糖苷水解酵素序列，針對該家族的所有蛋白質來源，利用 SDSC WORKBENCH 生物資訊網站進行演化樹分析與詳細的胺基酸序列比對，結果分別摘錄於圖 7-1-16 與圖 7-1-17。從演化樹分析結果可發現家族 GH-64 之 β -1,3-葡聚糖苷酵素大致分成四個演化群，而本實驗研究之 LPHase 酵素源自 *Streptomyces* 屬的原核細菌。從糖苷水解酵

素家族 GH-64 之蛋白質多重序列比對的結果，得知 LPHase 之蛋白質序列在 Asp¹⁴³ (D143)、Glu¹⁵⁴ (E154)、Asp¹⁷⁰ (D170)、Asp³⁷⁶ (D376)及 Asp³⁷⁷ (D377)等 5 個位置的酸性胺基酸屬於完全高度保守殘基，但當然也不乏其它中度之保守殘基，可能也與反應催化有著關鍵作用。因此，我們選擇幾個胺基酸 Aspartic acid 和 Glutamic acid 作突變，包括 Asp⁹³ (D93)、Asp¹⁴³ (D143)、Glu¹⁵⁴ (E154)、Asp¹⁵⁹ (D159)、Asp¹⁷⁰ (D170)、Asp¹⁸⁴ (D184)、Asp²²¹ (D221)、Asp³⁷⁶ (D376)及 Asp³⁷⁷ (D377)等九個突變點，利用催化水解合成之糖苷受質 *p*-NLPG 和卡德蘭膠作用的動力學數據和 相對活性比改變。當為 LPHase 酵素催化反應所扮演之重要殘基，必造成催化活性(或反應速率)急遽下降，可達 1,000 倍以上。鑑定該酵素催化反應中，何者胺基酸扮演一般鹼性(或親核基)與扮演一般酸性重要催化基團的方法，更針對下面敘述各點，設計實驗來探討各突變株酵素的水解反應特性，進一步推測在催化活性位置所扮演的角色：

1. 由詳細的 pre-steady-state 和 steady-state 的動力學分析， K_m 可能會變小，若有大量的糖-酵素的中間體累積，因 $K_m = (E)(S) / \Sigma(ES)$ ，故當 $\Sigma(ES)$ 增加時， K_m 則自然變小。而且當催化重要殘基團突變成非解離性殘基如 Gly 或 Ala，造成催化反應過程中，缺乏鹼基協助水解反應或酸基質子協助離去，經由 k_{cat} (水解速率常數)及 k_{cat}/K_m 值，可知相對於野生株酵素之的水解速率步驟明顯變慢。
2. 由酵素的 pH-dependence 活性實驗反映出扮演一般酸/鹼催化殘基的游離情形(即其 pKa)，若突變成非解離性殘基如 Gly 或 Ala 等，將沒有游離狀況產生，其活性自然不受 pH 影響，所以檢視反應之 pH-profile 可得到相關的證據。
3. 加入疊氮(N_3^-)或其他的功能性酸根離子如：甲酸根($-COO^-$)作為親核性試劑，以取代酵素活化中心所扮演一般鹼催化基團之胺基酸突變株，其催化活性速率值可以大幅增加，並可能產生含 azide-sugar 鍵結的產物，藉由 ^1H-NMR 鑑定並判定酵素活化中心催化基團胺基酸所扮演之角色。

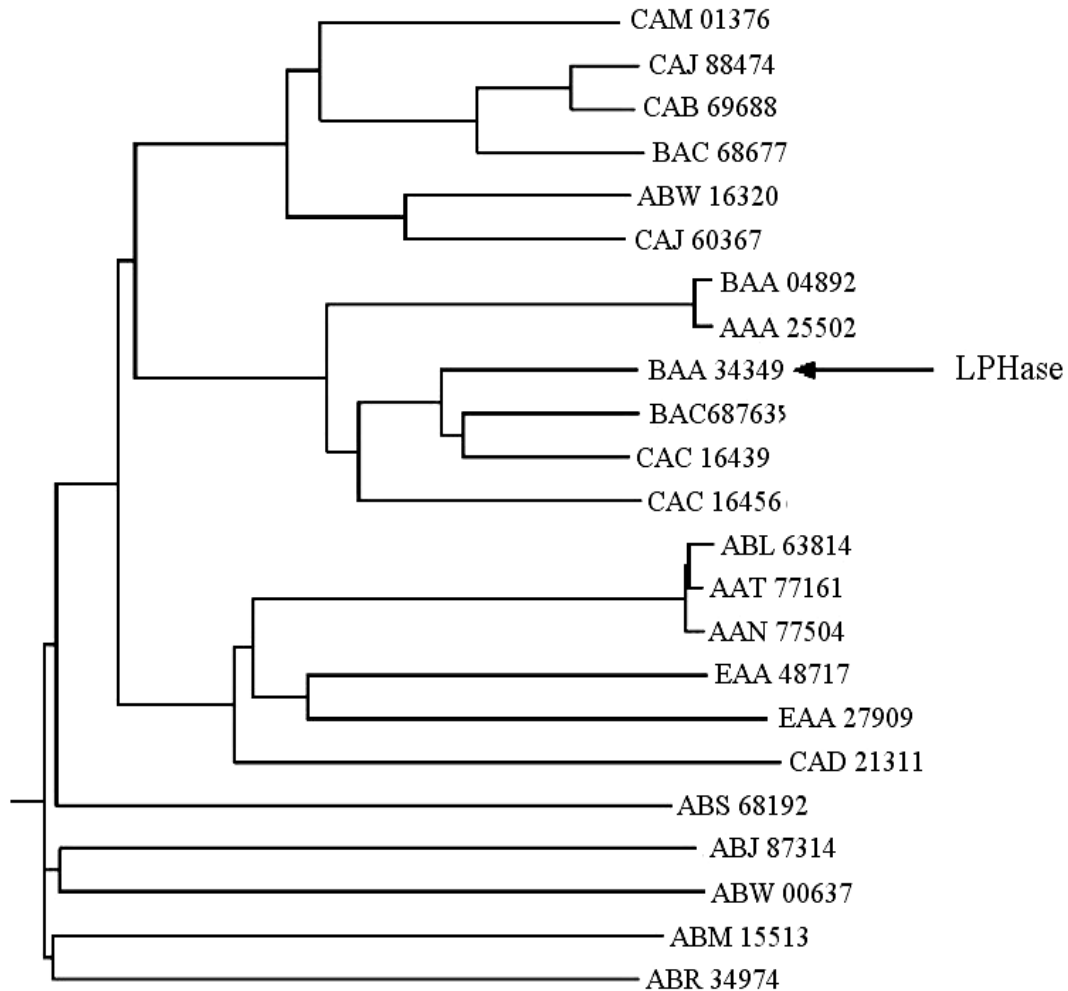


圖7-1-16、家族GH-64各菌種 β -1,3-葡聚糖水解糖苷酵素之演化樹狀圖。

以 Biology WorkBench 3.2 CLUSTALW (San Diego Supercomputer Center, CA, USA) 生物資訊網站軟體，比對糖苷水解酵素家族 GH-64 各菌種 β -1,3-葡聚糖水解糖苷酵素之胺基酸序列的相異性：真核菌種：EAA_48717 (*Magnaporthe grisea*70-15)、CAD_21311 and EAA_27909 (*Neurospora crassa* OR74A)。原核菌種：BAA_04892 (*Arthrobacter* sp. YCWD3)、AAA_25502 (*Cellulosimicrobium cellulans*)、ABR_34974 (*Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052)、ABW_16320 (*Frankia* sp. EAN1pec)、CAJ_60367 (*Frankia alni* ACN14a)、AAT_77161 (*Lysobacter enzymogenes* C3)、AAN_77504 (*Lysobacter enzymogenes* N4-7)、ABL_63814 (*Lysobacter enzymogenes* OH11)、ABS_68192 (*Xanthobacter autotrophicus* Py2)、BAC_68763 and BAC_68677 (*Streptomyces avermitilis* MA-4680)、CAB_69688, CAC_16456 and CAC_16439 (*Streptomyces coelicolor* A3) CAJ_88474 (*Streptomyces ambofaciens* ATCC 23877)、CAM_01376 (*Saccharopolyspora erythraea* NRRL 2338)、ABJ_87314 (*Solibacter usitatus* Ellin6076)、ABW_00637 (*Salinispora arenicola* CNS-205)、ABM_15513 (*Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1)、BAA_34349 (*streptomyces matensis* DIC-108)。

BAA34349.1	----LVQPAVQNPTDPNRDILFNWSEYTLN----DSGLWINSTQVDMFS--APYTVGVRR	182	BAA34349.1	TLLANP---HQP---DRSAAGFYQEPVTNHYARIHAH---MADGKAYGFAFDDVG---	379
CAC16439.1	----LVQPAVQNPSDPNRRILFNWSEYTLN----DGGLWLNSTQVDMFS--APYTVGVQR	180	CAC16439.1	STLLSNP---NQP---DPSAANFYRDPVTNHYARIHER---MADGKAYAFADFDDVG---	376
NP_631602.1	----LVQPAVQNPSDPNRRILFNWSEYTLN----DGGLWLNSTQVDMFS--APYTVGVQR	180	NP_631602.1	STLLSNP---NQP---DPSAANFYRDPVTNHYARIHER---MADGKAYAFADFDDVG---	376
CAJ89566.1	----LVQPAVQNPSDPNRRILFNWSEYTLN----DSGLWLNSTQVDMFS--APYTVGVQR	180	CAJ89566.1	STLLSNP---NQP---DASAANFYRESTNHYARVIHDR---MADGKAYAFADFDDVG---	376
BAC68763.1	----LVQPAVQNPSDPNRDILFNWSEYTLN----DSGLWINSTQVDMFS--APYAVGVQR	180	BAC68763.1	STLITNP---NQP---DTTTFAGFYQDVVTNHYARKIHAQ---MADGKAYAFADFDDVG---	377
NP_822228.1	----LVQPAVQNPSDPNRDILFNWSEYTLN----DSGLWINSTQVDMFS--APYAVGVQR	180	NP_822228.1	STLITNP---NQP---DTTTFAGFYQDVVTNHYARKIHAQ---MADGKAYAFADFDDVG---	377
CAC16456.1	----LVQPAVQNADDPNHDTLFNWTEYTLN----DSGLWINSTQVDMFS--APYSVGLTA	178	CAC16456.1	STLLTNS---EQP---DADASGFYRDDVTNHYARLVHAQ---MRDGQAYAFADFDDVG---	375
NP_631619.1	----LVQPAVQNADDPNHDTLFNWTEYTLN----DSGLWINSTQVDMFS--APYSVGLTA	178	NP_631619.1	STLLTNS---EQP---DADASGFYRDDVTNHYARLVHAQ---MRDGQAYAFADFDDVG---	375
BAA04892.1	----LVQPAVQNPSDPNRRILFNWTEYTLN----DGGLWINSTQVDMFS--APYQVGVQR	181	BAA04892.1	TTALTNP---NQP---DANSAGFYQDARTNVYAKLAHQ---MANGKAYAFADFDDVG---	376
AAA25520.1	----LVQPAVQNPSDPNRRILFNWTEYTLN----DGGLWINSTQVDMFS--APYQVGVQR	181	AAA25520.1	TTALTNP---NQP---DANSAGFYQDARTNVYAKLAHQ---MANGKAYAFADFDDVG---	376
CAJ60367.1	--NAALQHPAGWVRDPSYAVIHDFMEFTHN---ATGMFCNTTMVDMFS--VPLSIRLTG	184	CAJ60367.1	STLLTQP---SQP---ATDPATFYRDPVTNHYARVMHEN---TADGKAYGFADFDDVA---	365
CAB69688.1	--NAALQYPAGWVESDPNYAVLHDCAEFTYN---AAGMFCNTTMVDMFS--VPLAIRLTG	197	CAB69688.1	STLVSSA---EQP---TDDPATFYGTALTNYHAKAVHAA---TEDGRAYGFADFDDVA---	379
NP_625021.1	--NAALQYPAGWVESDPNYAVLHDCAEFTYN---AAGMFCNTTMVDMFS--VPLAIRLTG	197	NP_625021.1	STLVSSA---EQP---TDDPATFYGTALTNYHAKAVHAA---TEDGRAYGFADFDDVA---	379
CAJ88474.1	--NPALQYPAGWVASDPNHGVLHDCAEFTYN---SAGMFCNTTMVDMFS--VPLAIRLTG	201	CAJ88474.1	STLVSSA---DQP---TDDPATFYGTALTNYHAKAVHAA---TEDGRAYGFADFDDVA---	383
BAC68677.1	--NAALQYPAGWVESDPNYRVLHDCAEFTHN---SAGMFCNTTMVDMFS--VPLSIRLTG	199	BAC68677.1	STLVNDS---AQP---TDDPAAFYGSALANHYAKAIHAA---TEDGKAYGFADFDDVA---	381
NP_822142.1	--NAALQYPAGWVESDPNYRVLHDCAEFTHN---SAGMFCNTTMVDMFS--VPLSIRLTG	199	NP_822142.1	STLVNDS---AQP---TDDPAAFYGSALANHYAKAIHAA---TEDGKAYGFADFDDVA---	381
CAM01376.1	--KPALQYPAGWVSSDANRYVLDHDTVEFTFK---SDGMFCNTTMVDMFS--VPLSIRLTG	188	CAM01376.1	STLLDAT---DQP---GTDPAAFYRHQVTNHYSKVMHAN---TEDGKAYGFADFDDVA---	370
AAT77161.1	--GPAVVHPSFLNTSDTNFNKNWTFAEFTFN---EYELFSNISYDFVA--APLGLSLRS	173	AAT77161.1	TLLDNA---NQP---NGEVASRFY--RNAQTNHYARLVHER---LPDNRGYAFPYDDVTASG	371
ABL63814.1	--GPAVVHPSFLNTSDTNFNKNWTFAEFTFN---EYELFSNISYDFVA--APLGLSLRS	173	ABL63814.1	TLLDNP---NQP---NGEVASRFY--RNAQTNHYARLVHER---LPDNRGYAFPYDDVTASG	371
AAN77504.1	--GPAVVHPSFLNTSDTNFNKNWTFAEFTFN---EYELFSNISYDFVA--APLGLSLRS	173	AAN77504.1	TLLDNP---NQP---NGEVASRFY--RNAQTNHYARLVHER---LPDNRGYAFPYDDVTASG	371
ABJ87314.1	----TPIPPRAADPTDANYQTRWDFFEVYTLPLRGTDGLFNFNLSNVQSANLPLSPEVSG	179	ABJ87314.1	SVMLTTTLANAPDCAWCRATEKFYQDPTNHYSKAIHAN---AIDGLAYAFQSDHHC---	403
ABM15513.1	----WASPDGANPADPNYETVFDWYEMSVDN---GSVPFGNTTQVDFQF--FPFSFTVSG	576	ABM15513.1	GVATSPD-----DWNDVSAYYPAGGRWWDWARFFHAH---SLNGFAYGFYDDVNS---	769
ABQ07184.1	---SGYASPNQNATDPNQGILYEMIELTNN---QHGFPGNPTRVDSYK--YPMGLELFG	191	ABQ07184.1	HVVNTTT---ANPGQNWDYDASKYYQVNPNTNHYSKFWHLPGINIDLAYGFYDDVA---	395
EAA48717.1	GSSAALVEPSIMNADPNYQLNWSFCEFTLN---DVELFANISYDFVN--HPIALVLES	151	EAA48717.1	STLLINA---NQP---DGEQISTYY--TNTVTNHYSRILHEV---NIDKRGYAFPYDDVVPSG	355
XP_368869.1	GSSAALVEPSIMNADPNYQLNWSFCEFTLN---DVELFANISYDFVN--HPIALVLES	151	XP_368869.1	STLLINA---NQP---DGEQISTYY--TNTVTNHYSRILHEV---NIDKRGYAFPYDDVVPSG	355
EAA27909.1	GAGLALVEPSVTNDKDVNYEKEWGFVEFTFN---EFQLFANVSMVDLVGKCPASLGVIR	231	EAA27909.1	STLLINN---NQP---AGEEISTFYKSNNITNHYSRVHHQN---SPKGGYAFPYDDVSRTE	455
XP_326360.1	GAGLALVEPSVTNDKDVNYEKEWGFVEFTFN---EFQLFANVSMVDLVGKCPASLGVIR	231	XP_326360.1	STLLINN---NQP---AGEEISTFYKSNNITNHYSRVHHQN---SPKGGYAFPYDDVSRTE	455
CAD21311.1	GGGAALVEPSVLNPSDPNRDVFDFAFCEFTLN---DHQLFANISYDFVPRLPALTLVE	160	CAD21311.1	SSIIDCE---DQPS--DVETFYRWHVDGRPTNHYARVVHEW---NADGKAYAFYDDVQKDG	480
EAA32456.1	GGGAALVEPSVLNPSDPNRDVFDFAFCEFTLN---DHQLFANISYDFVPRLPALTLVE	160	EAA32456.1	SSIIDCE---DQPS--DVETFYRWHVDGRPTNHYARVVHEW---NADGKAYAFYDDVQKDG	480
XP_326573.1	GGGAALVEPSVLNPSDPNRDVFDFAFCEFTLN---DHQLFANISYDFVPRLPALTLVE	160	XP_326573.1	SSIIDCE---DQPS--DVETFYRWHVDGRPTNHYARVVHEW---NADGKAYAFYDDVQKDG	480

* * . * :
: * * . :
. * :: * . . * * **

圖 7-1-17、醣苷水解酵素家族 GH-64 中，所有細菌(Bacteria)和真核生物(Eukaryota)之 β -1,3-葡聚糖水水解糖苷酵素的多重序列比對。

BAA34349.1 即為 *Streptomyces matensis* 菌株分泌之 Laminaripentaose-producing β -1,3-glucanase (LPHase)，紅色標示為保守性之酸性胺基酸 D143、E154、D170、D376 和 D377 (胺基酸編號根據 LPHase 序列而定)，其中僅 ABJ87314.1 之 D170 位置為 V166，故亦將 D170 歸類為保守性殘基，各蛋白質 GenPept 編號的表示意義請見附錄 XVII。(利用 ClustalW：<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/> 分析比對蛋白質序列)

7-1-11、 β -1,3-葡聚五糖生產水解糖苷酵素突變株之純化及活性分析

經由 Quick Change method (Stratagene Co.) 得到的各定點突變株酵素，其純化方式和野生株一樣，經過一連串離子交換管柱層析，利用氯化鈉的鹽類梯度與溶液 pH 值梯度改變，將突變株酵素沖提出來，並收集有活性之分流後，藉由 SDS-PAGE 分析得知蛋白質純度達 95 % 以上，分子量大小約為 40 kDa (見圖 7-1-6_B)。再分別針對 LPHase 之野生株與各定點突變株酵素對膠狀卡德蘭膠受質的水解活性進行分析，在溫度 37 °C，50 mM 磷酸緩衝溶液(pH 7.5)中反應，隨後以 DNS 試劑偵測還原糖生成量的 OD₅₄₀ 吸收值，以求得各定點突變株酵素相對於野生株的單位蛋白質濃度之催化活性比，見下列表 7-1-5。

表 7-1-5、LPHase 之野生株與各突變株酵素對卡德蘭膠之相對作用活性。

LPHase 突變酵素	相對活性 % *	LPHase 突變酵素	相對活性 % *
Wild type	100	D170G	~0
D93G	90	D170N	~0
D143G	93	D170E	81
D143N	95	D184G	92
E154G	~0	D184N	89
E154Q	~0	D221G	96
E154D	19	D221N	94
D159G	93	D376G	91
D159N	94	D377G	85

* 野生株與各突變株酵素(濃度:~2.13 mg/ml)和 2 % 膠狀卡德蘭膠，在 37 °C，50 mM 磷酸緩衝溶液 (pH 7.5)中作用 2 小時後，再與 DNS 試劑反應，偵測 OD₅₄₀ 吸收值，換算對野生株之相對活性比。

由表 7-1-5 中，清楚顯示各定點突變株酵素對糖苷受質卡德蘭膠的相對作用活性比，可發現兩殘基 Glu¹⁵⁴ 和 Asp¹⁷⁰ 之各定點突變株酵素的水解催化活性降低至約 ~0 %，而其它殘基 Glu⁹³、Glu¹⁴³、Glu¹⁵⁹、Glu¹⁸⁴、Glu²²¹、Glu³⁷⁶ 及 Glu³⁷⁷ 等定點突

變株酵素則仍保有 80 % 以上的作用活性比。為了確定這些定點突變株酵素對整體活性反應的變化差異影響，乃由各殘基之突變而非受酵素的整體二級結構改變所造成。我們將針對上述各失去含原有羧酸基團(即 Asp 置換成 Gly)的突變株酵素，以圓二極光譜儀(CD)來加以分析，見圖 7-1-18 所示，從圓二色性光譜對這些突變株酵素所作二級結構光譜掃描，發現與野生株酵素極相近，仍維持酵素原有二級結構或整體之間的作用氫鍵引力。因此，推測這些仍保有 80 % 以上水解活性的殘基位置之突變株酵素，皆非該酵素的重要催化殘基。有些可能並不位於催化活性區內，或在催化活性區內，可能只是單純的突變造成酵素與受質彼此間的親和力或氫鍵作用力…等減弱之因素，影響整體酵素之催化反應活性。

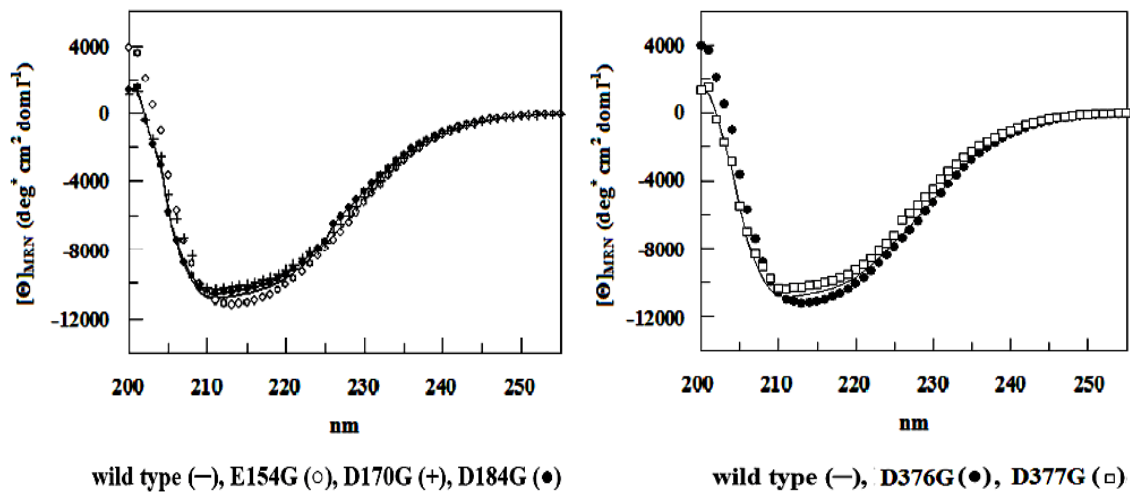


圖 7-1-18、重組 LPHase 酵素野生株與各突變株之圓二色光譜比較。

從圓二色性光譜顯示這些突變株酵素，仍維持原有整體酵素之二級結構。因此，我們隨後進一步對 LPHase 之野生株酵素與 E154Q、D170N 兩突變株酵素，分別與 2 % 膠狀卡德蘭膠，在溫度 37 °C，50 mM 磷酸緩衝溶液(pH 7.5)中進行 time course 的水解反應活性分析。以觀測在各不同作用時間點的單位蛋白質濃度中，所催化水解產生 β -1,3-葡聚糖之還原糖生成量濃度和酵素反應活性，見圖 7-1-19 所示。由圖中，可發現失去作用羧酸基團的胺基酸 Glu¹⁵⁴ 和 Asp¹⁷⁰ 兩突變株酵素，於各不同作用時間

點，皆呈現極低的相對酵素反應活性。當計算酵素於 15 分鐘時，兩突變株 E154Q 和 D170N 之單位酵素濃度對卡德蘭膠所催化的初始反應活性速率，分別降低約為野生株酵素的 336 和 1014 倍(水解活性速率：野生株= 7.098 [P(mM)/E_t(mM)'min]，E154Q= 0.021[P(mM)/E_t(mM)'min]，D170N= 0.007[P(mM)/E_t(mM)'min])。由此實驗結果，造成 LPHase 酵素之催化活性降低的 Glu¹⁵⁴ 和 Asp¹⁷⁰ 兩胺基酸，極可能為扮演酵素催化的重要殘基；因以其他胺基酸突變、取代原有所含之作用羧酸基團，而非因酵素二級結構破壞，致使酵素反應活性降低。這些數值與現象說明 Glu¹⁵⁴ 和 Asp¹⁷⁰ 為 LPHase 酵素活化中心所扮演的重要催化殘基團，我們將於下面詳述討論 Glu¹⁵⁴ 和 Asp¹⁷⁰ 兩胺基酸所扮演之角色。

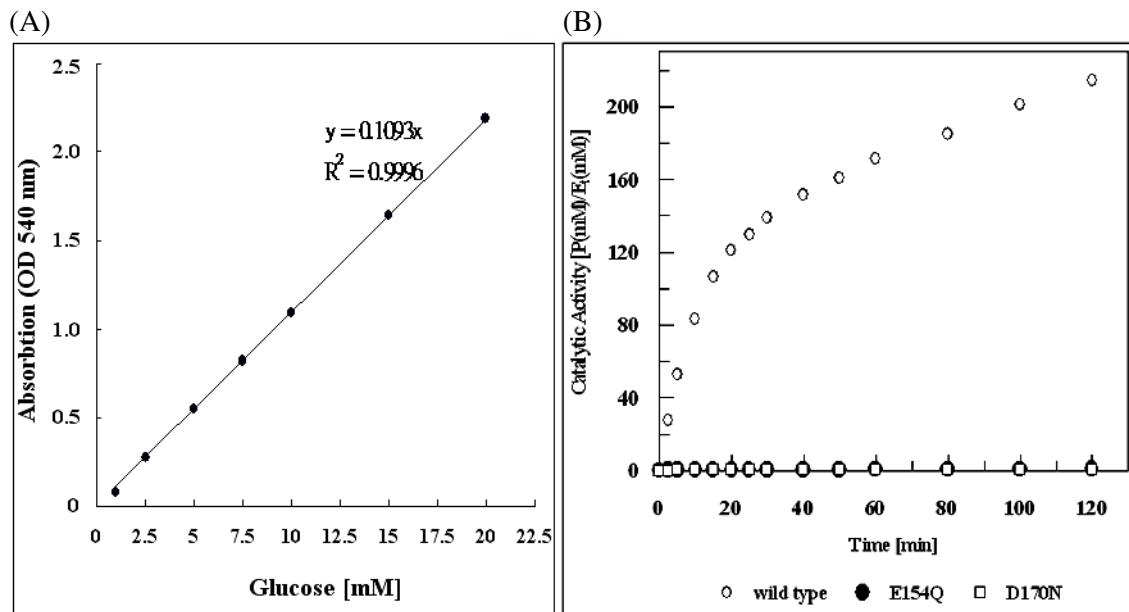


圖 7-1-19、LPHase 之野生株與 E154Q 和 D170N 兩突變株酵素，在各不同反應時間對卡德蘭膠受質之催化水解活性。

(A) 以偵測不同濃度(1~20 mM)之葡萄糖/DNS 反應的 OD₅₄₀ 吸收值，作為 β-1,3-葡聚五糖產物之還原糖生成量的相對濃度檢量線。(B) 野生株、E154Q 與 D170N 三酵素在標準反應條件下，於不同時間點催化水解卡德蘭膠受質的反應活性。(反應活性 [P(mM)/E_t(mM)]之單位定義:承接圖(A)中，每單位蛋白質濃度(E_t, mM)催化水解的產物還原糖生成量之 OD₅₄₀ 吸收值，換算所相對於葡萄糖之濃度(P, mM))。

7-1-12、 β -1,3-葡聚五糖生產水解糖苷酵素之動力學速率研究

酵素於固定酸鹼值的溶液及溫度條件下進行水解反應，對特定之受質有特異的 K_m 值。 K_m 為受質與酵素之複合體(enzyme-substrate complex; ES complex) 的真正解離常數或顯現解離常數(apparent dissociation constant)。由 K_m 值之大小可判斷受質與酵素之親和力，而 k_{cat} 則為酵素之催化常數或 turnover number，它表示酵素催化反應中化學催化步驟的一級反應速率常數，亦即將 ES complex 經化學轉化而成酵素與產物之步驟。家族 GH-64 之 β -1,3-葡聚五糖生產水解糖苷酵素，其催化反應機制，已由酵素與受質反應的立體選擇性變化之 $^1\text{H-NMR}$ 圖譜研究，得知為單取代-反轉反應機制。一般而言，此反應機構為單一個重要水解步驟(S_N2 -like)所組成，化學催化步驟見下面流程：



k_{cat} ：水解速率，此步驟為一不可逆反應

pNLPG：p-nitrophenyl- β -1,3-Laminaripentaose，NP：nitrophenol，LPG： β -1,3-Laminaripentaose

此時的 k_{cat} (s^{-1}) 值大小，用來判斷此 LPHase 酵素水解反應(glycosylation) 的速率快慢決定步驟，而 k_{cat}/K_m ($s^{-1}M^{-1}$) 的定義是代表酵素催化一受質的催化效率，也可說是當酵素與受質結合後把受質催化的反應速率值。一般而言， K_m 值的求法可用以下兩種方法求得：Michaelis-Menten equation 及 Lineweaver-Burk method 作雙倒數圖(double reciprocal plot)，兩者計算結果並無太大的差距。雖然卡德蘭膠對 LPHase 酵素而言，是一最佳反應糖苷受質，但藉由 UV 偵測合成之糖苷受質 p-nitrophenyl- β -1,3-pentaglucoopyranoside (p-NLPG) 中，芳香族基團被 LPHase 酵素催化水解的過程，能對該 LPHase 酵素的水解反應速率之 K_m 及 k_{cat} 值更佳了解。本研究所使用 K_m 及 k_{cat} 值之計算方式，主要是採用作雙倒數圖，詳細描述於章節 6-15。

將前面描述以離子交換管柱層析純化，所取得蛋白質純度達95 %以上的LPHase之野生株與各定點突變株酵素，對合成之糖苷受質 p -NLPG進行催化反應速率分析。在溫度40 °C，50 mM磷酸緩衝溶液(pH 7.1)中反應，於UV吸收波長400 nm觀測水解反應吸收值變化，測量各定點突變株酵素的初始反應速率，見附錄XV之表。隨後針對以突變成非解離性胺基酸Gly的各殘基位置之突變株酵素，進行詳細的反應速率 k_{cat} 及 k_{cat}/K_m 值分析，見下列表7-1-6。

表 7-1-6、LPHase 之野生株與各突變株 酵素對合成之糖苷受質 p -NLPG 反應的 Michaelis-Menten 參數表。

Enzyme	k_{cat} (s ⁻¹) ^a	K_m (mM)	k_{cat}/K_m (s ⁻¹ M ⁻¹)
Wild-type	8.1 ± 0.1	1.60 ± 0.02	5063
D93G	7.7 ± 0.1	1.61 ± 0.01	4813
R115Q	6.8 ± 0.3	1.68 ± 0.01	4023
D143G	7.8 ± 0.2	1.59 ± 0.03	4906
D159G	8.0 ± 0.1	1.60 ± 0.01	5000
D184G	7.9 ± 0.1	1.57 ± 0.01	5031
D221G	7.8 ± 0.2	1.57 ± 0.02	4968
D376G	7.7 ± 0.1	1.58 ± 0.01	4873
D377G	7.2 ± 0.2	1.69 ± 0.01	4260
E154G	0.0083 ± 0.0004	2.35 ± 0.03	3.53
E154Q	0.009 ± 0.0001	2.33 ± 0.01	3.86
D170N	0.0014 ± 0.0005	3.06 ± 0.02	0.46
D170G	ND ^b	ND	
Sodium azide ^c	0.19 ± 0.02	1.96 ± 0.02	96
Sodium formate ^d	0.057 ± 0.003	2.04 ± 0.03	28

a. 酵素動力學分析於 50 mM 磷酸緩衝溶液，pH 7.1，40 °C，吸收波長 400 nm。*b.* ND: 表在標準的酵素動力學偵測系統下無法讀取吸收值變化)。*c.* D170G 突變株動力學分析於含 2.5M 疊氮鈉之 50 mM 磷酸緩衝溶液，pH 6.8，40 °C，吸收波長 400 nm。*d.* 同 *c.* 之突變株酵素分析於含 0.5 M 甲酸鈉之 50 mM 磷酸緩衝溶液，pH 5.5，40 °C，吸收波長 400 nm。

經由動力學反應速率數據可發現野生株 LPHase 酵素，對合成之糖苷受質 p -NLPG 的催化反應速率值遠不及卡德蘭膠強烈，可能受酵素中之糖苷結合次單位區域的作用力有所影響。而檢視實驗結果與**章節 7-1-11** 亦相同，除了 Glu¹⁵⁴ 和 Asp¹⁷⁰

兩胺基酸之催化反應速率 k_{cat}/K_m 值，分別降低約為野生株酵素的 1/1700 和 1/2000 倍，其他各作用殘基的突變株酵素在反應速率值(k_{cat} 及 k_{cat}/K_m)上，皆與野生株酵素不會有太大的差異，乃因突變成非解離性胺基酸 Gly，造成酵素與受質間親和力減弱(部分氫鍵消失)的關係，影響催化反應，亦非整體酵素之二級結構被破壞。

7-1-13、酸鹼度對 LPHase 野生株與突變株酵素之活性影響

酵素存在於不同酸鹼度的反應溶液中，對整體酵素催化活性上會有其不同差異。因此，將適量濃度之純化野生株 LPHase 酵素與合成的糖苷受質 *p*-NLPG (濃度為：0.05 mM~5 mM)，置於不同酸鹼值的緩衝溶液中，所使用的緩衝溶液及其酸鹼值為：Glycine/HCl (50 mM，pH 3)、Citric (50 mM，pH 3.5)、NaOAc (50 mM，pH 4、4.5、5、5.5)、MES (50 mM，pH 5.5、6)、 Na_2HPO_4 (50 mM，pH 6.5、7、7.5)、Hepes (50 mM，pH 7.5、8)、Tris (50 mM，pH 8、8.5)、Glycine/NaOH (50 mM，pH 9、9.5、10)、Caps (50 mM，pH 10、10.5)、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaOH}$ (50 mM，pH 11、11.5)，於 40 °C 條件下，以 UV 波長 348 nm 記錄反應吸收值之變化，測量其初始反應速率。將不同酸鹼值下所得到的初始反應速率以作雙倒數圖，計算 K_m 以及 k_{cat} 相關反應數值，再將這些數值對酸鹼值作圖，即可得知在不同酸鹼值中對酵素反應活性的影響。

對於糖苷水解酵素(Glycoside hydrolase)的研究中，若 pH-profile 呈現對稱鐘型曲線(bell-shaped curve)的趨勢，表示酵素活性由兩個 pK_a (apparent pK_a)之重要催化殘基調控催化反應，受外在溶液 pH 的高低而顯現出胺基酸的游離，而此兩個 pK_a 值反應出代表酵素兩個重要殘基(分別以 B 和 AH 代表)在催化過程中所扮演的重要角色。圖 7-1-20 可以明顯的看出其趨勢為鐘型曲線，在低 pH 值(EH_2 form 之存在比例較多)和高 pH 值(E^{2-} form 之存在比例較高)其活性均明顯下降，在 pH 7.5 ~ 8.5 其 LPHase 酵素有較強之活性，所相對應的反應 pH 值即扮演兩重要催化殘基之胺基酸

pKa：各為 6.0 (B⁻)及 10.1 (AH)，由此推論具有催化活性的酵素為單一解離態(mono deprotonated form):



於一般大多數的 醣苷水解酵素研究中，所呈現對稱鐘型曲線 (bell-shaped curve)之 pH-profile 趨勢圖中，酵素活性反應的兩個重要殘基之 pKa 解離差值(ΔpKa)約為 2~3，但從圖 7-1-20 中，可發現野生株 LPHase 酵素催化的反應活性之兩 pKa 解離差值($\Delta\text{pKa} = 4.1$)，遠大於其它一般醣苷水解酵素催化殘基胺基酸所表現的解離差距值。因此，推測是否在酵素的活化中心或催化反應過程中，有其他高解離 pKa 值之胺基酸，如 Arg、Lys、Tyr...等，協助 LPHase 酵素對糖苷受質 *p*-NLPG 的催化作用，造成此酵素活性反應之 pH-profile 趨勢的改變，而這問題將於章節 7-2-5，配合酵素晶體結構作詳盡的討論。

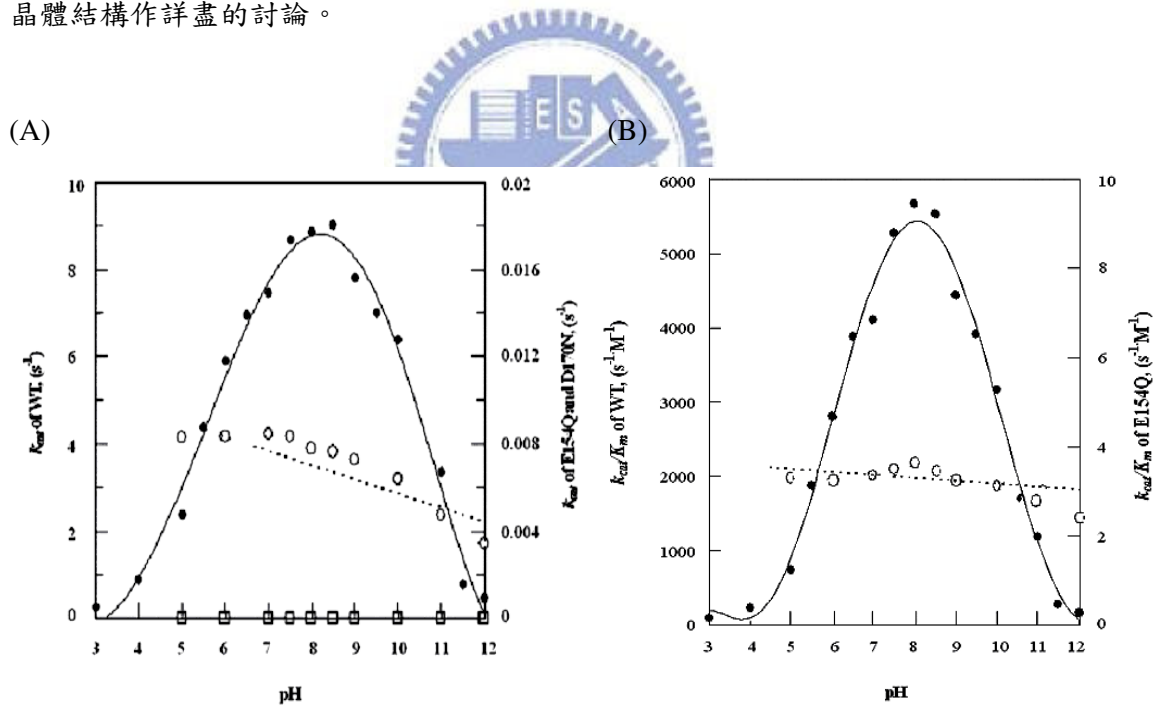


圖 7-1-20、野生株與突變株酵素對糖苷受質 *p*-NLPG 水解反應之 pH-profile。

(A) 在 50 mM 的各不同 pH 值 (pH 3.0~12.0) 緩衝溶液中，LPHase 野生株 (●)、突變株 E154Q (○)與 D170N (□)酵素對糖苷受質 *p*-NLPG，於 40 °C 進行水解反應，所求得各 pH 值之 k_{cat} 值。(B) 為 LPHase 之野生株(●)與突變株 E154Q (○)酵素對糖苷受質 *p*-NLPG 反應，所求得各 pH 值之 k_{cat}/K_m 值。

檢視圖 7-1-20 中，以不同 pH 值對 k_{cat} 及 k_{cat}/K_m 做圖，得知野生株 LPHase 酵素的催化反應活性之 pH-profile 為一鐘形曲線(bell-shaped curve)，反應出調控酵素之催化反應的兩個重要催化殘基胺基酸，而其 pK_{a1} (6.0)之解離值應與酵素催化反應所扮演一般鹼催化(或親核性基團)胺基酸有關；另一 pK_{a2} (10.1)的解離值則反應於扮演一般酸催化基團角色之胺基酸。乃因參與酵素催化反應的一般酸/鹼催化基團受外在溶液 pH 值的高低而顯現出酸/鹼基團的游離。若移去該兩個重要催化羧酸殘基團 ($-COO^-$)之突變酵素，於催化反應過程中便無法顯現此特性，必會造成酵素的反應活性 pH-profile 有所改變。

為了證實 Glu¹⁵⁴ 和 Asp¹⁷⁰ 兩胺基酸在 LPHase 酵素中所扮演是否為一般酸/鹼催化的重要殘基角色？因此，我們分別以純化之突變株 E154G/Q、D170G/N 與野生株 LPHase 酵素，進行在不同酸/鹼度中活性之比較，於反應條件 40 °C，上述 50 mM 各不同 pH 值的緩衝液中，以合成之糖苷受質 *p*-NLPG 在波長 348 nm 下觀測。由於 E154Q 的 K_m 較大，所以我們在受質濃度遠大於 5 倍 K_m 值的條件下進行實驗，故所得之 k 值約等於 k_{cat} 值，以不同反應溶液 pH 值對 k_{cat}/K_m 做圖，即可得其關係圖如圖 7-1-20。從圖 7-1-20_A 發現，當突變株 E154Q 酵素的側鏈殘基失去含有催化羧酸基團時，不再呈現與野生株類似的鐘型曲線，從圖中觀察，當突變株 E154Q 在反應緩衝溶液 pH 值 6.0~12.0 時，催化反應速率 k_{cat} 值有漸緩慢下降的改變。若以酵素與受質結合後受質催化的反應速率值 (k_{cat}/K_m)也幾乎無變化近似一水平線(見圖 7-1-20_B 所示)。明顯顯示突變株 E154Q 酵素所呈現之 pH-profile 曲線(curve)，似為扮演一般酸催化殘基被移去，隨反應溶液 pH 值增加而無法進行提供質子化步驟的催化反應，此現象結果亦被發現於扮演一般酸催化突變株的單取代反轉機制之 醣苷水解酵素家族 GH-43 的 β -D-Xylosidase⁽²¹⁴⁾。因此，顯示說明在 LPHase 酵素中，胺基酸 Glu¹⁵⁴ 在酵素的催化反應中扮演一般酸催化殘基角色；當該重要催化殘基缺少了一個羧酸基團(即 Glu→Gly/Gln)後，對酵素催化反應活性亦造成嚴重影響。

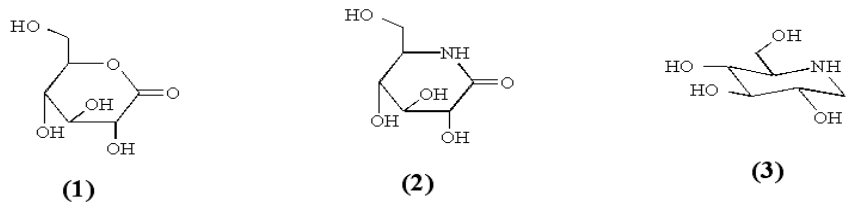
當以失去原有羧酸基團的突變株 D170G/N 酵素，因無解離之羧酸殘基團可造成極化水分子之緣故，整體的突變酵素催化活性 k_{cat} 值下降~1,100 倍以上，見表 7-1-6 所示，其酵素反應速率 k_{cat} 值所呈現之 pH-profile 曲線已不再與野生株有類似的鐘型曲線，如圖 7-1-20_A 所示，明顯其催化活性不受 pH 影響，幾乎近乎於零數值之水平線。顯示該重要催化殘基少了一個羧酸基團(即 Asp→Gly/Asn)後，對催化水解反應亦造成極嚴重影響。可能原因是胺基酸 Asp¹⁷⁰ 突變成 Asn¹⁷⁰ 後，Asn 所處環境已無法允許其保留 pKa 值之特性，於正常 pH 值下無法呈現解離狀態，故於 pH-profile 中無法反應其 pKa 的解離曲線(curve)，亦說明 Asp¹⁷⁰ 在酵素的催化反應可能為扮演一般鹼催化殘基角色，此將於接下來實驗結果加以證明。

7-1-14、抑制劑的研究

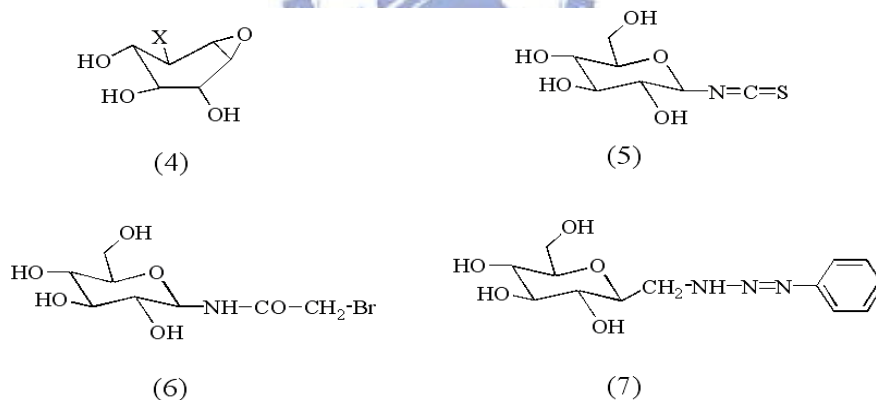


抑制作用之研究，可有效地利用以模擬酵素與受質之間的結合作用，更是探究酵素催化機構的重要方法。抑制劑可分為兩大類：一為可逆抑制劑 (reversible inhibitors)，另一為不可逆抑制劑 (irreversible inhibitors)。

可逆抑制劑可於探索酵素活性區之特性幫助瞭解催化反應機構。例如：以過去典型 β -葡萄糖苷酵素的逆抑制作用研究為例，已於許多文獻報告過，其中以含氮之雜環化合物，如咪唑類 (4-phenylimidazole) 是此酵素之最佳天然抑制劑。下圖中 δ -gluconolactone (1) 與 δ -gluconolactam (2) 亦是極強之抑制劑，如此強的親和力被歸因於其結構與反應機構中之可能中間體類似，亦即與 oxocarbonium 類似。而以糖基為主的衍生物亦陸續被合成出，如：Nojirimycin^(204,205)、Glycals⁽²⁰⁶⁾、Aldonolactones⁽²⁰⁷⁾ 這一系列衍生物也是糖苷酵素極強的可逆抑制劑，其中以下圖 1-Deoxynojirimycin (3) 為最佳。



利用不可逆抑制劑，可直接於活化中心位置，作用在酵素催化的過程中與作用的殘基鍵結，藉此判定催化作用中重要的胺基酸殘基。此法已廣泛用於β-葡萄糖苷酵素的研究上。如：溴-環己六醇(bromo-inositol)衍生物、自身環氧衍生物(epoxide derivatives) (4)、異硫氰基衍生物(isothiocyanate derivatives) (5)⁽²⁰⁸⁾、N-溴乙醯基葡萄糖基氨(N-bromoacetyl glycosylamine derivatives) (6)⁽²⁰⁹⁾和三氮烯衍生物(Triazene derivatives) (7)^(210,211)均是不可逆抑制劑(見下圖)。這些不可逆抑制劑直接與β-葡萄糖苷酵素的活化部位共價鍵結，而研究結果也顯示有一天冬門酸(aspartate acid)的重要作用胺基酸殘基被鍵結，並配合Edman degradation胺基酸定序或二次質譜法以研究標示物的位置。



上述研究策已廣泛用於雙取代的糖苷酵素反應機制上。因此，我們試圖將這類方法，用於單取代反轉機制之LPHase酵素的重要胺基酸殘基鑑定上。在反轉催化反應中，鑑定扮演一般鹼性(或親核基)之重要胺基酸，和另一扮演一般酸性重要胺基酸之位置上，最有利的證據仍是利用活性位置不可逆抑制劑標示法；但對於這類的相關抑制劑合成不易且在文獻上也尚未有關LPHase酵素的抑制劑相關報導。因此，本實驗嘗試以合成 *O*-hydroxyl-1-(2,3-epoxypropyl)-β-1,3-D-pentaglucoopyranoside

(EPLPG)⁽²¹²⁾ 與 1-O-(2-difluoromethyl-4-nitrophenyl)- β -1,3-D-pentaglucoopyranoside (2DFMNLPG)⁽²¹³⁾ 兩結構類似物(合成步驟見**章節 6-13-3**與**6-13-4**)，來進行酵素抑制作用。選擇合成此兩抑制劑，乃基於理論結構之推演與相關類似官能基抑制劑之研究作用，可能具有不可逆抑制的反應作用。期許能和該 LPHase 酵素中重要胺基酸殘基 (nucleophilic 或 general acid/base) 之側鏈羧酸基團產生共價鍵結，並合以液相串聯式質譜儀-勝肽圖譜技術鑑定重要胺基酸殘基之位置。

首先，將純化過之野生株 LPHase 酵素分別與 10 mM 抑制劑 EPLPG 和 2DFMNLPG 混合，置於 37 °C 中預熱存放，隨各不同反應時間點逐一定量取樣，與 2 % 受質膠狀卡德蘭膠進行 2 小時水解反應，後加入等量體積 DNS 試劑於 95 °C 反應，偵測還原糖生成量之 OD₅₄₀ 吸收值變化，見**圖 7-1-21** 所示。結果發現隨酵素-抑制劑混合液的存放時間增長，酵素與卡德蘭膠反應之活性測試和無加抑制劑的對照組下活性沒有受到抑制；同時，利用液相串聯式質譜儀分析，發現並未偵測有任何鍵結抑制劑之蛋白質分子量訊號。因此，這兩抑制劑 EPLPG 和 2DFMNLPG 並無法與 LPHase 酵素形成共價鍵結體，推測原因可能為 LPHase 為 S_N2-like 之反轉催化機制，無法似雙取代的受質糖-酵素之催化機制中，中間體形成理論，以合成過渡狀態的類似抑制劑，進行不可逆抑制鍵結作用。

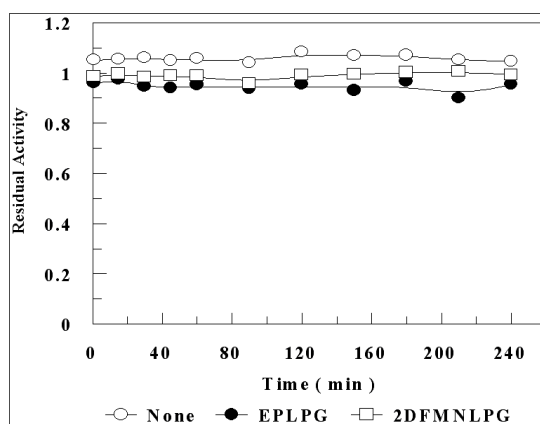


圖 7-1-21、LPHase 野生株酵素在含有抑制劑的溶液中，隨存放之反應時間點與受質卡德蘭膠進行水解作用的殘餘反應活性。

7-1-15、陰離子親核性試劑對 LPHase 突變株酵素催化反應之影響

由前述以不可逆抑制劑標示蛋白質重要催化殘基之方法明顯不可行。因此，藉以利用一酵素古典分析法-化學活性復活法，加入一些具親核性的陰離子及功能性酸根使突變株酵素回復部分活性，此為用於鑑定扮演一般酸/鹼催化殘基的間接證據方法。在保留機制的糖苷水解酵素，對扮演一般酸/鹼催化殘基的鑑定研究文獻中，藉由加入具親核性攻擊作用的陰離子包含有：疊氮、DTT、2-mercaptoethanol、硫代硫酸鈉及功能性酸根(甲酸、醋酸、檸檬酸、磷酸…等)等，作為內競爭型親核劑，以自身自由的孤對電子對(lone pair)，取代扮演一般酸/鹼催化之羧酸殘基的突變株酵素，增加所失活突變株酵素之水解反應速率(deglycosylation step)，讓好的糖苷受質(其速率決定步驟是 deglycosylation step)之催化速率 k_{cat} 值亦可以增加 20-200 倍。在反轉機制糖苷水解酵素扮演一般酸/鹼殘基鑑定研究中亦為相似原理，藉由加入內競爭型親核性的陰離子試劑，以取代扮演一般鹼殘基的突變酵素，催化機制可為一自身作為親核性攻擊的角色，或另一作為鹼基以極化水分子再行親核攻擊。

檢視各突變株酵素之反應速率(k_{cat} 、 k_{cat}/K_m)值與催化相對活性比得知， β -1,3-葡聚五糖生產水解糖苷酵素可能的重要催化殘基為 Glu¹⁵⁴ 和 Asp¹⁷⁰ 兩胺基酸，兩者皆可能當作一般酸催化或是一般鹼催化之基團。以化學離子解離度而言，胺基酸 Aspartic acid (Asp/D) 之支鏈(side chain)的 pKa 值約為 3.8，略小於胺基酸 Glutamic acid (Glu/E) 支鏈的 pKa 值 4.3，顯然 Asp 比 Glu 更容易去質子化(deprotonated)，故推測在進行酵素催化作用時，易去質子化之 Asp 當作催化鹼基，而質子化之 Glu 則當作質子的提供者。因此，我們在此提出一反假設，以 Glu¹⁵⁴ 為親核性殘基，而 Asp¹⁷⁰ 為質子的提供者，則當針對突變株 E154G 酵素，於外加疊氮親核性陰離子試劑時，酵素催化活性會復活^(189,190)，因突變株 E154G 酵素殘基所執行的功能已由外加的親核性物質代替，利用其上的孤對電子對進行親核性的攻擊；而改以突變株 D170G 酵素(扮演質子提供

者角色)進行水解反應時，即使於酵素反應進行前外加親核性物質，酵素的活性會大大地降低，失去酵素的催化活性。

但於實驗所觀察的結果，證實上述反假設確實不可行；見圖 7-1-22 所示。當以突變株 E154G 酵素，在含有不同濃度親核性陰離子試劑的 50 mM 磷酸緩衝溶液 (pH 7.5) 中，與 2 % 膠狀卡德蘭膠進行水解反應，結果發現隨外加親核性陰離子試劑(疊氮鈉)和功能性酸根離子試劑(甲鈉)的濃度增加時，突變株 E154G 酵素的催化活性，一直呈現失活狀態，以 DNS 試劑測試水解反應後之還原糖生成量，結果顯示 OD₅₄₀ 的吸收值和未加酵素之對照組相同，皆低於 0.1。相反地，當以突變株 D170G 酵素和 2 % 膠狀卡德蘭膠，在含不同濃度(0.05 ~ 4 M)之親核性陰離子試劑下，進行水解反應，所偵測到還原糖量的產物活性 OD₅₄₀ 吸收值，隨疊氮濃度增加而提高，達至一平緩狀態；但在功能性酸根離子試劑：甲鈉的作用下，雖酵素催化活性反應有所復活，但當外加濃度超過 1 M 以上時，酵素的催化活性隨之下降，推測可能過高濃度的甲鈉，對 LPHase 酵素的蛋白質結構或催化反應過程有所影響，見圖 7-1-22。

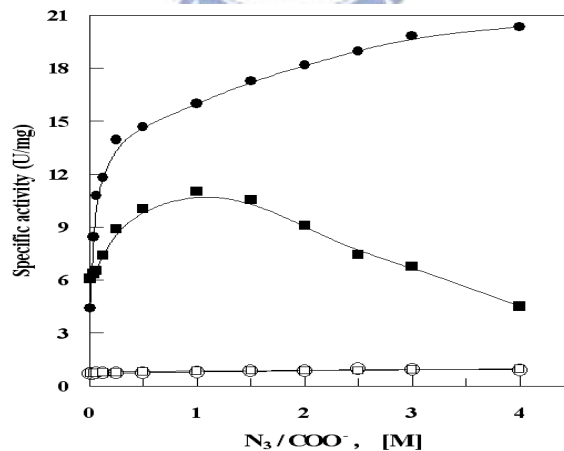


圖 7-1-22、LPHase 突變株 E154G 和 D170G 酵素與膠狀卡德蘭膠，在含不同濃度之親核性陰離子作用下，酵素活性復活變化。

酵素活性復活反應，突變株 E154G (○)和 D170G (●)酵素與 2 % 膠狀卡德蘭膠，在含各不同濃度疊氮之還原糖生成量 OD₅₄₀ 值。突變株 E154G (□)和 D170G (■)酵素在含有不同濃度甲鈉的還原糖生成量。

同時，以突變株 D170G 酵素對合成之糖苷受質 *p*-NLPG 進行活性復活的催化反應速率分析實驗中，於相同作用反應條件下，所加入一內競爭親核性疊氮陰離子 (0.5 M) 時，可以增加該突變株 D170G 酵素水解反應速率 k_{cat}/K_m 值達 72 倍效率；而甲酸根離子只增加了 26 倍，見表 7-1-6 所示。可發現陰離子親核劑疊氮鈉的親核性催化攻擊反應較甲酸鈉為佳。隨後並於各反應條件、狀態的水解作用後，利用液相-電噴灑質譜儀進行水解產物的偵測與分析，於含疊氮陰離子的突變株 D170G 酵素反應溶液中，可觀測分析到主要水解產物：葡聚五糖(laminaripentaose, $[M-Na^+]^+$, m/z 為 851.1)，以及微量葡聚五糖-疊氮結合體(laminaripentaose_azide, $[M-Na^+]^+$, m/z 為 876.2)之產物訊號；但此現象的產物訊號結果，並未於突變株 E154G 酵素的反應溶液中被偵測，見圖 7-1-23 所示。由此推斷，此 LPHase 酵素的催化活化中心中，Asp¹⁷⁰(D170) 所扮演為親核性殘基，Glu¹⁵⁴(E154) 為一般酸性催化殘基(即質子的提供者)。在外加親核性陰離子試劑於突變株 D170G 酵素時，疊氮陰離子上的自由電子對，取代酵素進行親核性攻擊反應，促使酵素催化活性復活；而突變株 E154G 酵素失去作用之羧酸殘基，無法有效作質子的提供，雖外加疊氮陰離子，亦無法使糖苷氧基發生質子化 (protonation)，而伴隨著配糖基(aglycone)的離開，則使得酵素仍失去應有的活性。

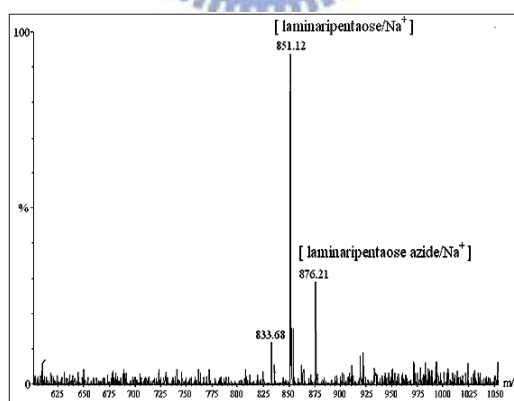


圖7-1-23、在含疊氮下，突變株D170G酵素與卡德蘭膠作用反應後的產物質譜分析。

隨後我們以突變株 E154G 和 D170G 兩酵素在含疊氮親核性陰離子幫助下，探討不同酸/鹼度溶液對活性的影響。在溫度 40 °C 下，於含濃度 1 M 疊氮的 50 mM

不同酸/鹼度緩衝溶液中，與合成之糖苷受質 *p*-NLPG 進行催化反應，觀測 UV 吸收波長 348 nm 的吸收值變化，測量分析兩突變株 E154G 和 D170G 酵素的初始反應速率 k_{cat}/K_m 值變化，見圖 7-1-24 所示。圖中顯示在含 1 M 疊氮陰離子的不同酸/鹼度溶液中，突變株 E154G 酵素催化水解糖苷受質 *p*-NLPG 之活性完全無被激化(activation)作用；但對突變株 D170G 酵素之反應則被激化。圖中在 pH 值 7.0~11.5 緩衝溶液催化活性之激化(activation)曲線關係，突變株 D170G 酵素在含有疊氮催化作用下，酵素活性被激化復活但隨著 pH 值增加而下降，呈現非完整之活性復活 pH-profile 曲線 (curve)，乃因對疊氮鈉和甲酸鈉而言，於溶液中之解離度(pKa 值)分別為 4.72 和 3.76，故實驗發現當低於 pH 5.0 之緩衝溶液中，突變株 D170G 酵素雖在含有此兩陰離子親核劑下，酵素活性仍幾近失活。而突變株 D170G 酵素反應所扮演一般酸催化殘基去質子化解離作用，pKa₂ 值亦由 10.1 改變移至 8.2，並缺少扮演一般鹼催化殘基解離作用 pKa₁ 值所呈現的結果現象。雖然疊氮與野生株反應並沒有使反應速率增加或明顯抑制作用，且從 CD 圖譜亦得知，突變株 D170G 酵素之二級結構維持與野生株相近似，顯示其將胺基酸 Asp 置換成 Gly 後，可提供足夠大的空間並排除電荷效應，讓陰離子疊氮充斥於酵素催化活性中心進行親核性攻擊反應，使失活的突變株 D170G 酵素得以復活。說明 LPHase 酵素中胺基酸 Asp¹⁷⁰ 為扮演一般鹼催化殘基角色。

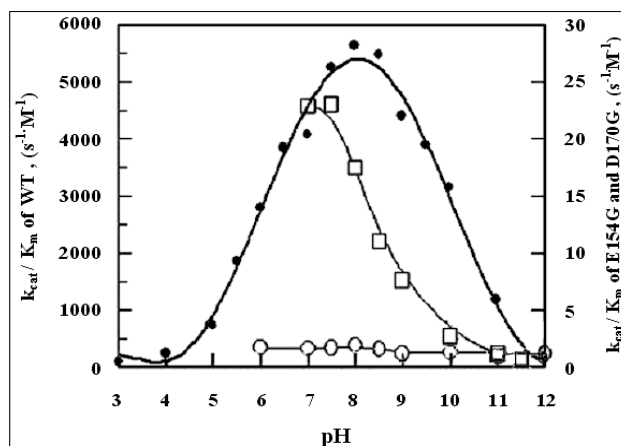


圖 7-1-24、野生株與含疊氮之突變株酵素，對糖苷受質 *p*-NLPG 催化反應之 pH-profile。各不同 pH 值(pH 3.0~12.0)緩衝溶液中，野生株(●)、含 1 M 疊氮之突變株 E154G(○)及突變株 D170G(□)酵素對受質 *p*-NLPG，於 40 °C 進行水解反應，所求得各 pH 值與 k_{cat}/K_m 值之作圖。

在單取代反應的反轉機制酵素中，對於扮演一般酸催化胺基酸的突變株酵素而言，以陰離子親核性試劑進行取代，無法觀測催化活性有復活反應；但對扮演一般鹼催化(或親核性基團)胺基酸的突變株酵素，當加入疊氮反應後，使酵素催化活性得以復活。而對加入的疊氮所參與之反應過程中，亦有兩不同機制之催化產物可能生成，一為疊氮自身作為親核性攻擊的角色，產物為 α -pentaglycosyl_azide；另一為疊氮作為鹼基以極化水分子行親核攻擊，產物為 α -pentaglycose，其作用機制見圖 7-1-25。

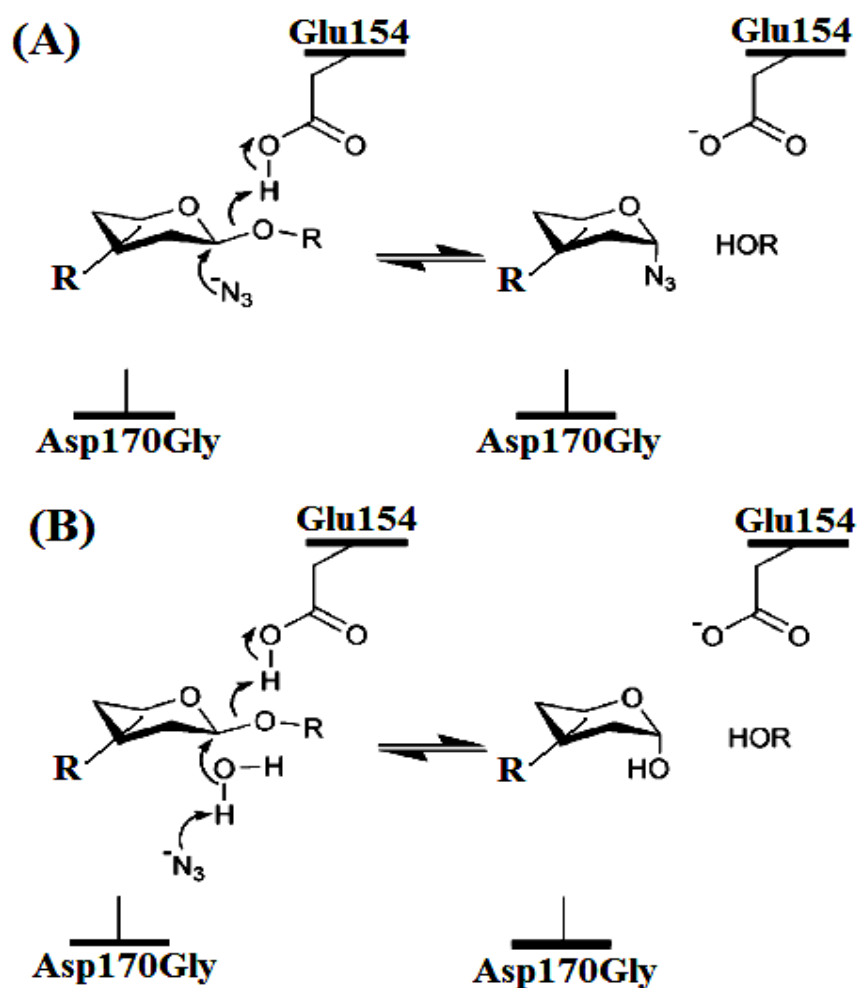


圖 7-1-25、為突變株 D170G 酵素與 azide 作用之可能產物的示意機制圖。

(A) N_3^- 自身作為親核性攻擊的角色，產物為 α -pentaglycosyl_azide。

(B) N_3^- 作為鹼基以極化水分子行親核攻擊，產物為 α -pentaglycose。

從上述實驗，疊氮(N_3^-)對突變酵素的活性復活反應佔很重要角色，藉由其它在突變株 D170G 酵素的催化復活反應過程中，判斷疊氮所扮演為親核性攻擊的角色或為以鹼基角色來極化水分子行親核攻擊中的何者？如此一來提供更直接證據來證明胺基酸 D170 所扮演為一般鹼催化基團的角色。從圖 7-1-23 之質譜分析，可初步發現突變株 D170G 在含 2.5 M 疊氮的反應環境下，可得產物 α -pentaglucose 和 α -pentaglucoyl_azide 結合體的訊號，且兩者的產量也大不相同(α -pentaglucose 多於 α -pentaglucoyl_azide 結合體)。因此，藉由 1H -NMR 圖譜來鑑定突變株 D170G 酵素與卡德蘭膠在含 1.5 M 的疊氮溶液環境下，所催化水解反應產物之立體選擇性。以氫核磁共振磁譜作長時間追蹤，觀察作用產物糖基分子的質子分裂與吸收峰變化，結果見圖 7-1-26 所示。在反應前，無化學位移(chemical shift)於 $\delta = 4.67$ ppm (β -form 糖基分子上碳 1 位置的質子)與 $\delta = 5.24$ ppm (α -form 糖基分子上碳 1 位置的質子)之分裂吸收峰。加入以 D_2O 置換的突變株 D170G 酵素溶液，反應 20 分鐘之後，於化學位移 $\delta = 5.24$ ppm 產生一分裂吸收峰，鑑定為 α -form 糖基分子上碳 1 位置之質子分裂訊號。隨反應時間至 85 分鐘後，化學位移 $\delta = 5.24$ ppm， $J_{1,2} = 3.6$ Hz 之 α -form 糖基上碳 1 之質子分裂吸收峰漸漸增加，並於化學位移 $\delta = 4.67$ ppm， $J_{1,2} = 8.1$ Hz 處產生新吸收峰，此為 β -form 糖基分子上碳 1 位置之質子化學位移分裂訊號，乃因 α -form 糖基在溶液中進行 mutarotation 而形成 β -form 糖基，此時 $\alpha : \beta = 92:8$ 。將反應時間增加至 140 分鐘後，在 $\delta = 5.24$ ppm 之 α -form 糖基與進行 mutarotation 的 β -form 糖基($\delta = 4.67$ ppm)，兩不同之質子分裂吸收峰比例更為顯著，並於化學位移 $\delta = 5.52$ ppm， $J_{1,2} = 4.3$ Hz 處產生新的分裂吸收峰，經鑑定為 α -pentaglucoyl_azide 結合體之糖基分子上碳 1 位置的質子化學位移分裂訊號。從 1H -NMR 的圖譜觀察，水解反應的過程中，以 α -form 糖分子生成為主要催化作用；意謂疊氮在突變酵素的催化過程，主要以作為鹼基以極化水分子行親核攻擊。所以，LPHase 酵素的催化活化中心，Asp¹⁷⁰ 扮演為一般鹼性催化殘基(即親核性攻擊者)。

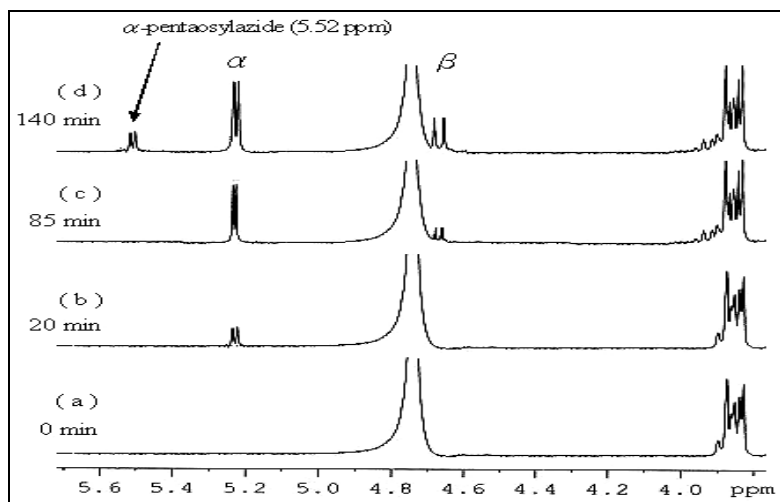


圖 7-1-26、突變株 D170G 酵素在含疊氮親核性陰離子下，與卡德蘭膠隨時間作用之 $^1\text{H-NMR}$ 光譜。



7-1-16、E154D 和 D170E 兩突變株酵素對催化反應之影響研究

在 LPHase 一系列突變株的動力學與反應活性測試結果中，發現 Glu^{154} 和 Asp^{170} 兩突變點對催化活性有著明顯下降的改變，並在 pH-profile 與加入陰離子親核劑之化學活性復活等實驗結果，也確切說明 Glu^{154} 和 Asp^{170} 這兩位置胺基酸，在 LPHase 蛋白質催化反應過程中，分別扮演一般酸 (Glu^{154}) 和一般鹼 (Asp^{170}) 之催化重要殘基。從酵素催化的活化中心這兩羧酸基團 ($-\text{COO}^-$) 扮演重要催化作用角色，並從文獻亦可知，對於反轉催化機制，為讓受質與水分子足以同時進到此活化中心，兩催化羧基群立體空間的氧原子間距離為 $10 \pm 0.5 \text{ \AA}$ 。然而在保留反應機制酵素的例子中，如： α -葡聚醣水解酵素催化殘基之羧基群，平均氧原子間的距離為 $4.8 \pm 0.5 \text{ \AA}$ ，而 β -葡聚醣水解酵素則為 $5.3 \pm 0.2 \text{ \AA}$ 。

在保留這兩催化羧酸基團下，以定點突變方法互換成彼此所代表之胺基酸，即分別為 E154D 和 D170E，改變 LPHase 活化中心兩催化羧基群原有立體空間之距

離，從胺基酸之側鏈 (side chain) 長度，可發現 Aspartic acid (D) 較 Glutamic acid (E) 為短 (因少了一個 methylene group)，所以，對突變株 E154D 酵素整體而言，無疑是增長兩催化羧基群立體空間之距離；相反，突變株 D170E 酵素，則是縮短兩催化羧基之距離，藉此觀察突變後的 LPHase 催化機制，速率或水解產物是否改變。利用這兩突變株 LPHase 與合成之 *p*-NLPG 糖苷受質和膠狀卡德蘭膠反應作用，從表 7-1-5 之相對反應活性與表 7-1-7 之動力學數據，發現突變株 E154D 酵素，對合成之糖苷受質 *p*-NLPG 和膠狀卡德蘭膠反應作用，分別 $k_{cat}=0.34\text{ s}^{-1}$ ， $K_m=1.82\text{ mM}$ 和 19 % 相對殘餘活性；而突變株 D170E 酵素，則為 $k_{cat}=5.3\text{ s}^{-1}$ ， $K_m=1.72\text{ mM}$ 和 81 % 相對殘餘活性，清楚顯示保留催化羧基群的兩突變株酵素相較於突變成 Gly/Asn 或 Gln 反應活性皆有救回效果，但在催化反應上突變株 E154D 所表現出在反應催化速率上卻沒有大幅增加。相信是突變株 E154D 酵素中，Asp 所處之環境已呈解離狀態，此與野生株中 Glu 於催化初始步驟中仍呈質子化狀態不同。當受質糖在突變株 E154D 的催化反應上，先受酵素扮演一般鹼催化的胺基酸所極化之水分子進行親核性攻擊後，另一扮演一般酸催化的胺基酸卻無法同時使糖基上氧基團有效的質子化反應而離去，造成催化反應速率較慢。而這也再次說明胺基酸 Glu¹⁵⁴ 為扮演一般酸催化之殘基角色。

表 7-1-7: 為 LPHase 野生株、E154D、D170E 和兩修飾突變株 D170C 酵素，與合成之糖苷受質 *p*-NLPG，所進行催化反應之 K_m 與 k_{cat} 動力學數據表^a。

	$k_{cat}\text{ (s}^{-1}\text{)}$	$K_m\text{ (mM)}$	$k_{cat}/K_m\text{ (s}^{-1}\cdot\text{M}^{-1}\text{)}$
Wild type	8.09 ± 0.02	1.59 ± 0.01	5056
E154D	0.34 ± 0.02	1.82 ± 0.02	187
D170E	5.36 ± 0.01	1.72 ± 0.02	3081
D170C	ND	ND	
D170C(ss)	2.28 ± 0.02	1.67 ± 0.03	1365
D170C(ds)	0.035 ± 0.003	1.75 ± 0.02	20
5 M IOAc ^b	ND	ND	

c. 動力學反應條件：酵素與合成之糖苷受質 *p*-NLPG，在 37 °C，UV 吸收波長 400 nm，50 mM 磷酸緩衝溶液(pH 6.8)。

d. 同 a.之反應條件，無加任何酵素的對照組實驗反應。

相較於縮短催化殘基距離之突變株D170E酵素而言，並無缺少因一般酸催化殘基上質子化反應空間的作用影響。再者，以液相-電噴灑質譜儀分析突變株E154D和D170E與膠狀卡德蘭膠水解反應後之產物，其產物皆為 β -1,3-葡聚糖。因此，有一懷疑造成突變株D170E酵素的反應有所微弱的降低，是否為酵素之催化反應機制有所改變了？為了研究D170E突變株酵素的反應機構是否轉變？我們以氫核磁共振磁譜來觀察突變株D170E酵素與卡德蘭膠催化反應之情形，結果見圖7-1-27。在反應前，受質卡德蘭膠並無化學位移(chemical shift)於 $\delta = 4.67$ ppm (β -form糖基分子上碳1位置的質子)與 $\delta = 5.24$ ppm (α -form糖基分子上碳1位置的質子)之分裂吸收峰。加入以 D_2O 置換的突變株D170E酵素溶液後，隨時間反應至25分鐘，於化學位移 $\delta = 5.24$ ppm， $J_{1,2} = 3.6$ Hz一分裂吸收峰產生，此為 α -form糖基分子上碳1位置的質子分裂訊號；當反應時間增加至4小時後， α -form的糖基在溶液中進行 mutarotation 而形成 β -form糖基，於化學位移 $\delta = 4.67$ ppm， $J_{1,2} = 8.1$ Hz處產生 β -form糖基分子上碳1位置的質子分裂吸收峰，此時 $\alpha:\beta = 76:24$ 。由此看來，突變株D170E酵素反應所得之產物仍為 α -form糖基，也就是反轉構形(inversion configuration)的催化機制，可見突變株D170E酵素，催化反應仍維持反轉機制，而於反應活性上的改變，可能原因為活化中心結構與受質卡德蘭膠作用引力或殘基所處環境呈現的解離狀態有所改變了。

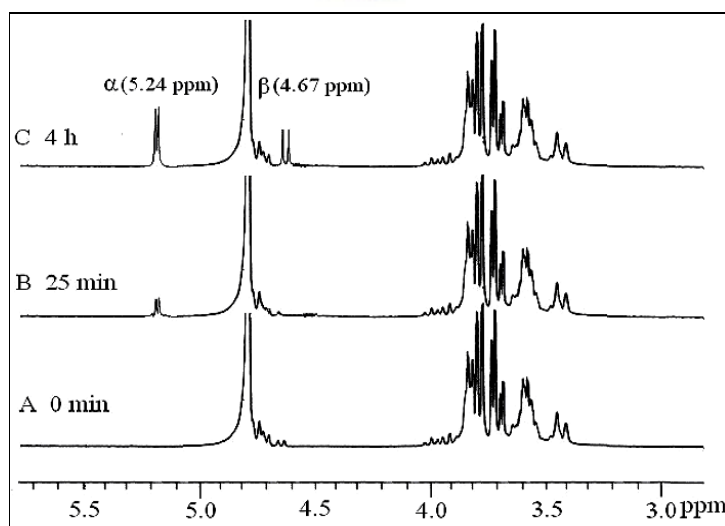


圖 7-1-27、突變株 D170E 酵素與卡德蘭膠隨時間作用之 ¹H-NMR 光譜。

由上述的實驗，對扮演一般鹼催化基團 D170 在保有催化的羧酸基團下，雖將胺基酸側鏈增加一個鍵長距離(即突變株 D170E 酵素)，酵素反應活性降低了約~20%，但在催化機制上仍維持反轉構型，猜測突變株 D170E 酵素並未縮短兩重要催化殘基團，至保留構型機制的催化間距即約 $< 5.5 \text{ \AA}$ 。從野生株之晶體結構中，以 PyMOL 程式軟體量測到兩重要催化殘基上氧基(oxygen group)彼此平均距離約 7.04 \AA 。因此，我們將嘗試以化學鍵結修飾法，逐一改變一般鹼催化胺基酸 D170 殘基側鏈長度，觀察催化重要殘基團距離的縮短改變對 LPHase 酵素在催化產物和機制構型有何影響？

首先，以定點突變法將 D170 突變成 C170，隨後和其它突變株相同之表現、純化方式，取得純度 $>95\%$ 的突變株 D170C 酵素。雖然在一些蛋白質水解酶中胺基酸 Cys 之側鏈- CH_2SH 基團也是一重要催化胺基酸，但於突變株 D170C 中將側鏈- CH_2COO^- 以- CH_2SH 取代後，發現在糖苷酵素水解作用上，對水的極化作用很小，造成對糖苷受質 *p*-NLPG 和膠狀卡德蘭膠之水解作用，皆無催化活性反應。將突變株 D170C 酵素分別加入，各含有 5 mM 醋酸碘與 5 mM 二硫代二乙酸標示反應劑的 50 mM Tris 緩衝溶液(pH 值 7.6~8.5)反應環境下，進行胺基酸 Cys 側鏈-SH 基團與醋酸碘和二硫代二乙酸作用反應，分別鍵結成為- $\text{S-CH}_2\text{COO}^-$ 和- $\text{S-S-CH}_2\text{COO}^-$ 兩不同側鏈基團，使突變株 D170C 酵素恢復保有催化之羧酸基團，同時，修飾增加胺基酸側鏈鍵長長度，進而縮短酵素活化中心兩重要殘基團的催化距離 (見圖 7-1-28 所示)，並分別命名為 D170C(ss)和 D170C(ds)。在突變株 D170C 酵素與兩標示反應劑作用的過程中，以 LC/MS 分析突變株 D170C 酵素的反應分子量變化，從圖 7-1-29 之液相質譜分析可發現未作用標示鍵結的蛋白質分子量約為 39413Da，待反應 12 小時後，蛋白質 D170C(ss) 分子量為 39470Da，約佔 90%，增加的分子量大小(57 amu)即為一個- CH_2COO^- ；另一反應的蛋白質 D170C(ds)分子量為 39502Da，也約佔 90%，所增加的分子量大小(89 amu)即為一個- $\text{S-CH}_2\text{COO}^-$ 。雖然在 LPHase 的序列中含有的兩個 Cys 胺基酸，從蛋白質晶體觀之，兩胺基酸位於 α/β 混合區域結構內部且未形成雙硫鍵 (見章節 7-2-2 和圖 7-2-26 描述)，但從所標示反應蛋白質的質譜中觀察，顯示兩標示反應劑並無和這

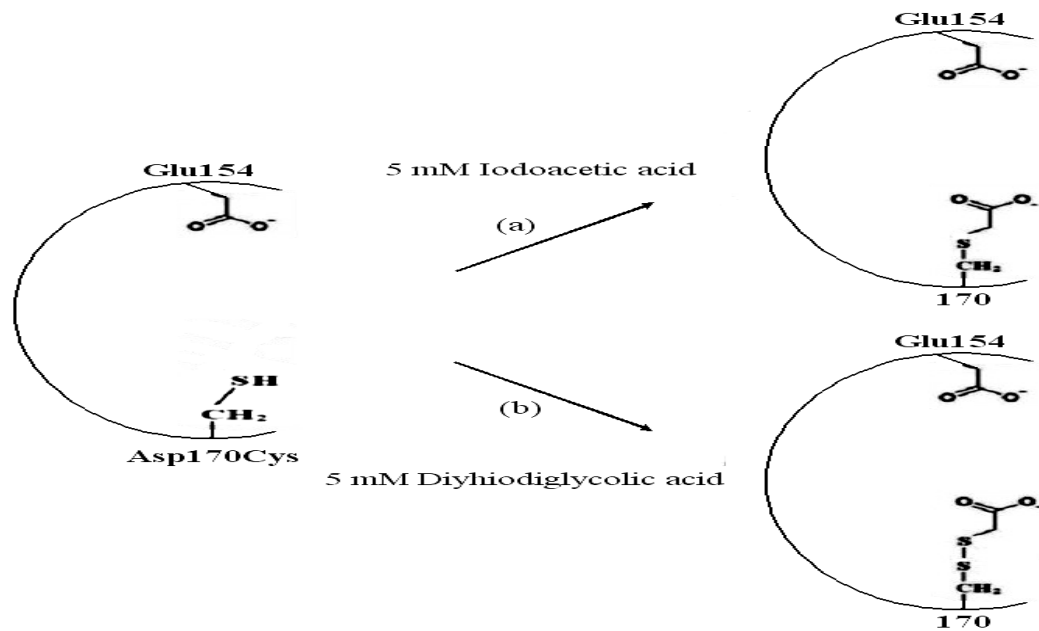


圖 7-1-28、突變株 D170C 與醋酸碘和二硫代二乙酸進行鍵結反應之示意圖。

(a) 為修飾突變株 D170C(ss)之標示反應，(b)為修飾突變株 D170C(ds)之標示反應。

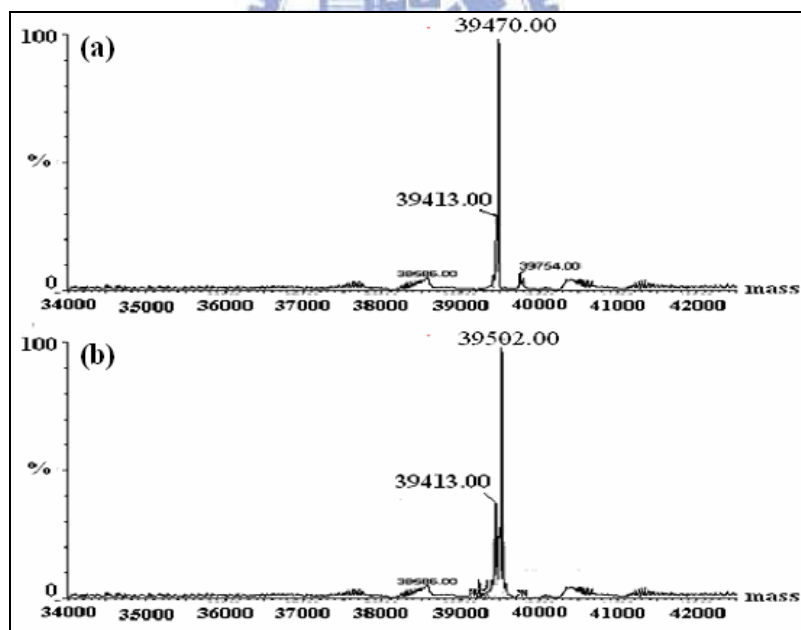


圖 7-1-29、突變株 D170C 與各修飾試劑，作用反應後之蛋白分子量質譜分析圖。

(a) 為標示反應後之修飾突變株 D170C(ss)質譜分子量 (39470Da)。

(b) 為標示反應後之修飾突變株 D170C(ds)質譜分子量 (39502Da)。

*未標示反應之突變株 D170C 質譜分子量 (39413Da)。

兩個 Cys 胺基酸作用鍵結。因此，往後的修飾蛋白質的標示反應，以此為作用條件並控制反應時間約 12 小時。標示鍵結後的修飾蛋白質利用透析膜在 20 mM 磷酸緩衝溶液(pH 7.5)進行透析，以除去未反應之醋酸碘和二硫代二乙酸。隨後將兩標示之修飾突變株 D170C(ss)和 D170C(ds)酵素對受質卡德蘭膠和合成之 *p*-NLPG 糖苷受質進行催化活性與反應速率之分析。結果發現隨著修飾化的殘基側鏈鍵長長度逐漸增加(側鏈長度大小: D170C(ds) > D170C(ss) > D170E > D170)，對反應受質卡德蘭膠的催化活性卻明顯降低(如圖 7-1-30 所示)。而對合成之 *p*-NLPG 糖苷受質作用的反應速率值上，分別是突變株 D170E 酵素: $k_{cat} = 5.36 \text{ s}^{-1}$, $k_{cat}/K_m = 3081 \text{ s}^{-1}\cdot\text{M}^{-1}$ 、修飾突變株 D170C(ss) 酵素: $k_{cat} = 2.26 \text{ s}^{-1}$, $k_{cat}/K_m = 1365 \text{ s}^{-1}\cdot\text{M}^{-1}$ 和 D170C(ds) 酵素: $k_{cat} = 0.035 \text{ s}^{-1}$, $k_{cat}/K_m = 20 \text{ s}^{-1}\cdot\text{M}^{-1}$ ，與野生株酵素的催化反應速率相比較分別下降了 1.6、3.5 和 231 倍(如表 7-1-7 所示)。

當酵素以保留催化機制進行的轉糖反應時，若外加一水分子以外的接受子作用時，在反應第二步驟的去糖基作用(deglycosylation)中，會被去質子化的羧酸基群(去質子酸)所活化，而進行第二波的親核性攻擊，水解糖基-酵素之中間產物，則釋放一保有與原受質鍵結位向構型之水解轉糖產物，來間接提供說明酵素為保留催化機制證據。因此，我們將野生株與兩修飾突變株 D170C(ss)、D170C(ds)酵素，分別加入含 15% 乙醇所配製的 2% 膠狀卡德蘭膠溶液(50 mM 磷酸緩衝溶液，pH 7.5)進行水解反應。從圖 7-1-30，可發現酵素在含有 15% 乙醇下的反應活性皆低於未加乙醇的反應環境，顯示反應溶液的極性受有機溶劑的改變，進而對 LPHase 酵素的催化反應速率有所影響；再者，以 LC/MS 分析各酵素與膠狀卡德蘭膠水解反應後之產物(見圖 7-1-31 所示)，皆為 β -1,3-葡聚五糖($m/z = 851.2$)，並未有任何轉糖產物的反應訊號。將兩修飾突變株 D170C(ss)、D170C(ds)酵素於氫核磁共振磁譜作長時間追蹤觀察，其催化反應依舊維持為單取代反轉機制。另在修飾突變株 D170C(ds)酵素的實驗結果中發現，酵素催化活性不但急遽降低，質譜分析上更偵測有 β -1,3-葡聚二、三、四、五糖不等的水解產物，顯示對受質水解作用的專一性也變差了。推測可能因胺基酸側鏈之解離度的改變，致使催化作用的反應催化速率下降；或因側鏈鍵長的增加，使其自由度也相對提高，影響於活化中心之所極化水分子的分布，對所鍵結於活化中心之受質糖之各位置糖苷鍵，增加了親核性攻擊反應機率，進而產生長度不等的 β -1,3-葡聚寡糖。

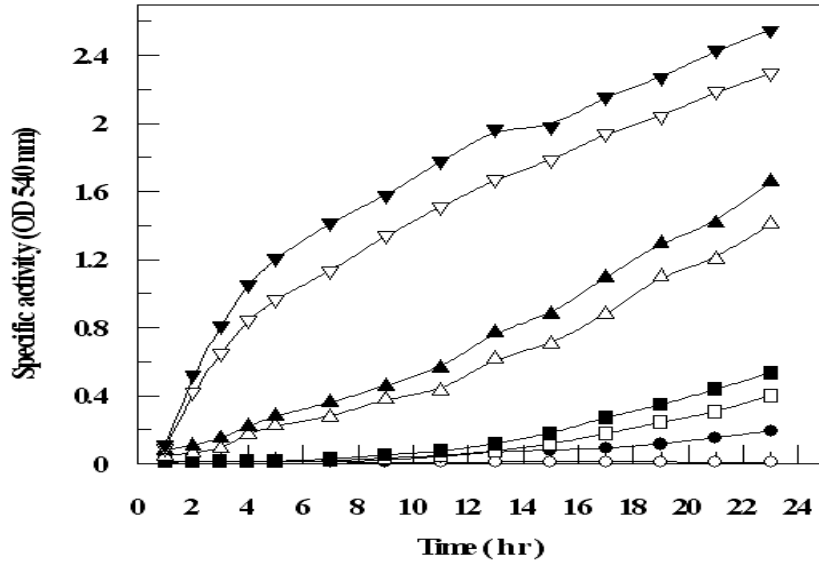


圖 7-1-30、LPHase 之野生株、突變株 D170C 與兩修飾突變株酵素，於含有或無乙醇下，與膠狀卡德蘭膠作用反應之活性變化。

(○) 5 mM 標示試劑溶液(對照組)。其他分別表：●)突變株 D170C 酵素。▽)野生株、△)修飾突變株 D170C(ss)與 □)修飾突變株 D170C(ds)酵素，反應於含有 15 % 乙醇的受質溶液。▼)野生株、▲)修飾突變株 D170C(ss)與 ■) 修飾突變株 D170C(ds)酵素，反應於無 15%乙醇的受質溶液。

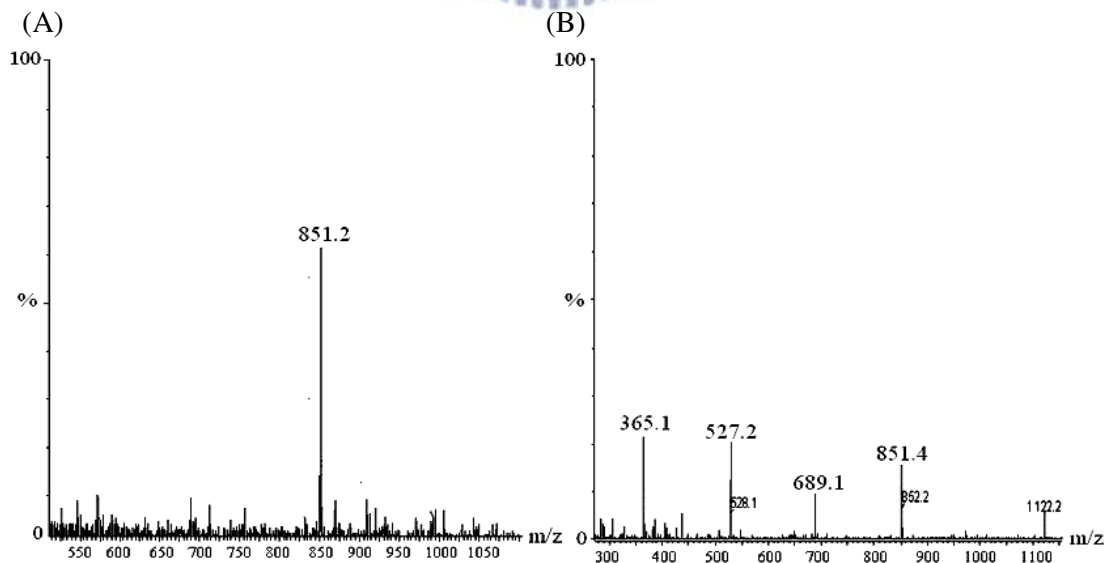


圖 7-1-31、修飾突變株酵素，與膠狀卡德蘭膠作用反應 10 小時後，產物質譜分析圖。

(A) 為修飾突變株 D170C(ss)酵素，(B) 為修飾突變株 D170C(ds)酵素。

7-2、 β -1,3-葡聚五糖生產水解酵素之晶體結構研究

7-2-1、酵素晶體成長、相位的篩選與尋找

蛋白質晶體結構於糖苷水解酵素反應中，活化中心催化的重要殘基與受質鍵結作用、判定提供一有利的證明，但各家族糖苷酵素的晶體研究至今仍是有限。而在 β -1,3-葡聚糖苷水解酵素眾多家族 GH-5、GH-16、GH-17、GH-55、GH-64、GH-81 之研究中，以 GH-5、GH-16、GH-17 三個糖苷酵素家族已有完整的酵素催化機制、殘基及晶體結構等相關文獻報導⁽¹⁷⁷⁻¹⁷⁹⁾。但對於反轉催化機制 GH-55、GH-64、GH-81 三家族之 β -1,3-葡聚糖苷水解酵素，其相關催化機制、殘基及晶體結構(除 GH-55 外，見圖 5-8 所示)研究文獻至今仍是有限。因此，本實驗研究將針對家族 GH-64 反轉催化機制之 β -1,3-葡聚五糖生產水解酵素為主，利用人造基因重組酵素，過量表現於大腸桿菌 BL21 (DE3)並與清大王雯靜老師實驗室合作，成功解析 LPHase 蛋白質晶體。這也是該家族 GH-64 第一個蛋白質晶體結構。(*此章節以下之內容，更詳盡的此酵素蛋白質晶體、結構數據，請參閱清大王雯靜老師之---徐銘聰研究生畢業論文)。

利用純化之野生株 LPHase 酵素作原始蛋白質晶體的長成，純化濃縮後的原始 LPHase，濃度約為 20 ~ 25 mg/ml，以懸吊液滴蒸汽擴散法培養蛋白質晶體，並篩選得較適合之完整晶體，見圖 7-2-2_A，其原始 LPHase 蛋白質晶體長成條件為：在 0.2 M 硫酸銨，30 % PEG-MME 5000，0.1 M MES (pH 6.5)；以 X-ray 分析收集晶體繞射數據，並試圖解決各胺基酸在 3D 晶體結構中相位問題。但因家族 GH-64 蛋白結構現階段尚無類似的已知結構。因此，LPHase 原始蛋白晶體在 X-ray 繞射下，所得電子雲分布數據、訊號，根本無法鑑別各原子所在相位。因此，採以利用浸泡重金屬(如：汞、金、鉑等)或以較重的原子取代胺基酸上的硫原子(如：硒原子)，來得到較強的訊號。根據重原子在特定能量具有高度的吸收峰之特性，利用多波長非尋常散射 (Multiple-wavelength Anomalous Dispersion, MAD) 的方法取得相位，建立蛋白質分子模型。

實驗中利用以浸泡重金屬篩選之過程，發現有些晶體的內部結構，因浸泡重金屬溶液之後而發生改變，顯然已經失去同晶型的特徵，無法利用多對同晶型置換法(Multiple Isomorphous Replacement, MIR)的方式來尋找出結構相位。再者，也有些晶體測試時，未能找到足夠強之訊號，推測原因可能：重金屬無法進入晶體內部特定位置，而僅附著於蛋白質表面，造成晶體與重金屬標示座標有差落。最後，採取以硒原子取代的硒化甲硫胺酸蛋白質作晶體長成與多次篩選，對於硒化甲硫胺酸 LPHase 蛋白質取得方式描述於 章節 6-20-2，經過與野生株 LPHase 原始蛋白質之相同純化步驟，並利用液相串聯質譜儀分析蛋白質分子量，見圖 7-2-1，可發現其分子量增加量為四個胺基酸 Cys 中硫原子被硒原子所取代之數目。硒化甲硫胺酸 LPHase 蛋白質晶體長成條件為：在 0.1 M 硫酸鋰，25 % PEG-MME 2000，0.1 M Tris (pH 7.0)，並經過篩選得到較適合之完整晶體，見圖 7-2-2_B。利用在多波長非尋常散射方法下取得相位，建立完整蛋白質分子模型，所得到完整相位的 LPHase 蛋白質結構，以軟體繪製於圖 7-2-3。

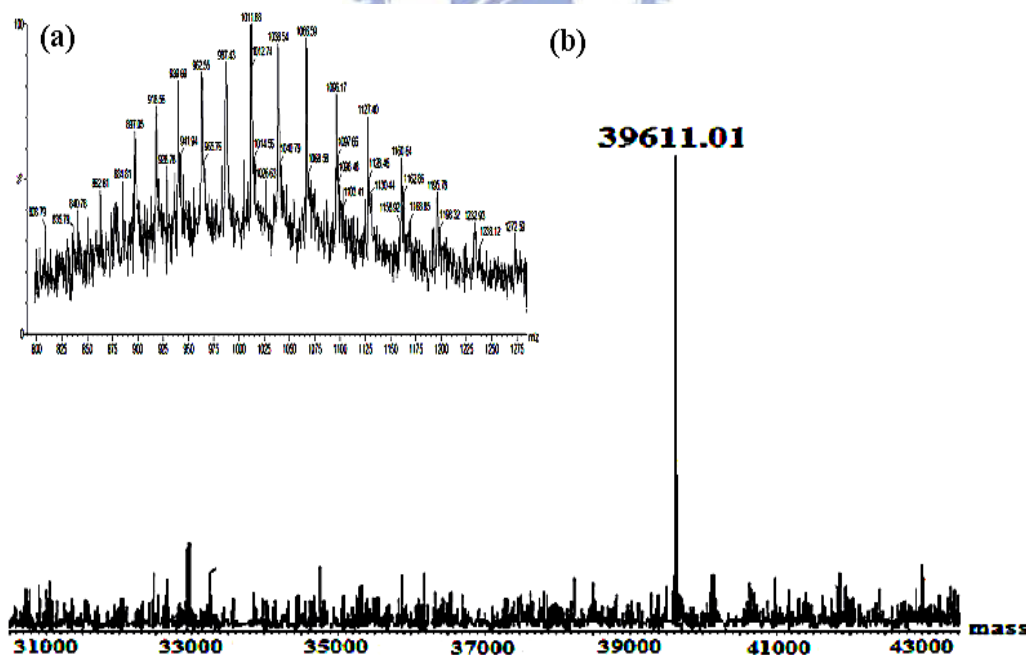
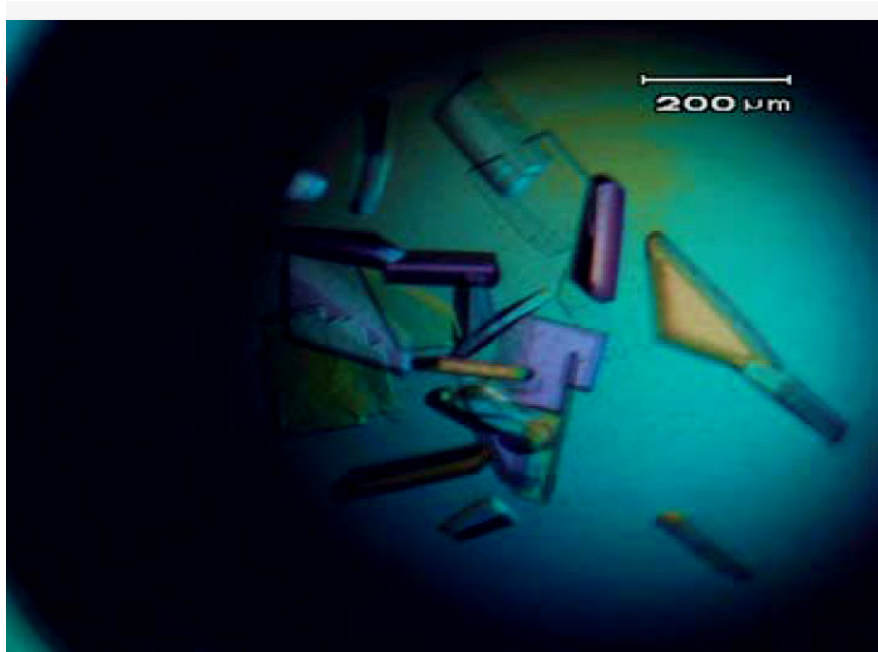


圖 7-2-1、硒化甲硫胺酸酵素之蛋白質分子量質譜分析圖。

(a) 以 LC/MS/MS 所撞碎蛋白質之各帶電荷片段 m/z 訊號。

(b) 由(a)之訊號積分所得之蛋白質分子量。

(A)



(B)

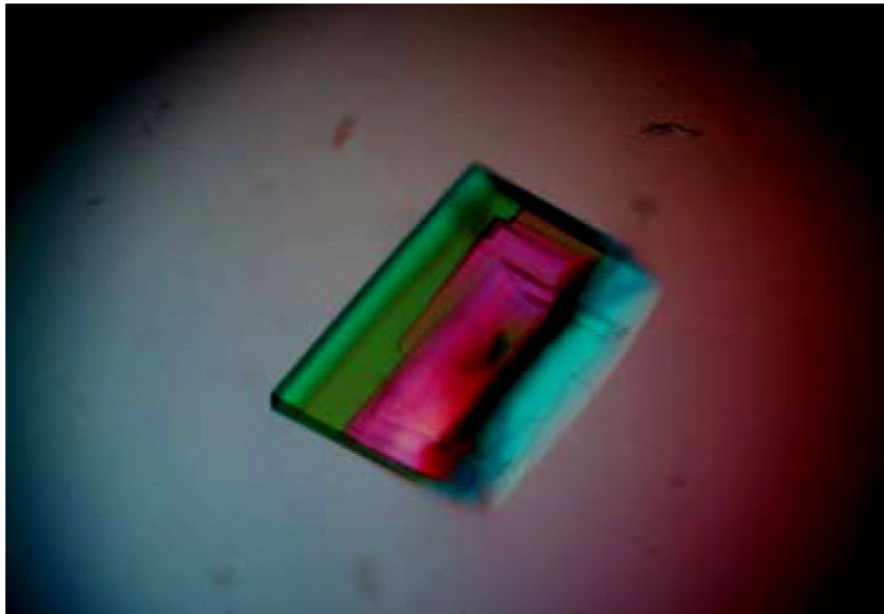


圖 7-2-2、篩選所得到的蛋白質晶體 (A)原始 LPHase，(B) SeMet-LPHase。

(A) 在條件 0.15 M 硫酸銨，30 % PEG-MME 5000，0.1 M MES (pH 6.5) 下所形成的原始 LPHase 晶體。(圖自清大王雯靜老師實驗室提供)

(B) 在條件 0.1 M 硫酸鋰，25 % PEG-MME 2000，0.1 M Tris (pH 7.0) 下所形成的 SeMet-LPHase 晶體。(圖自清大王雯靜老師實驗室提供)

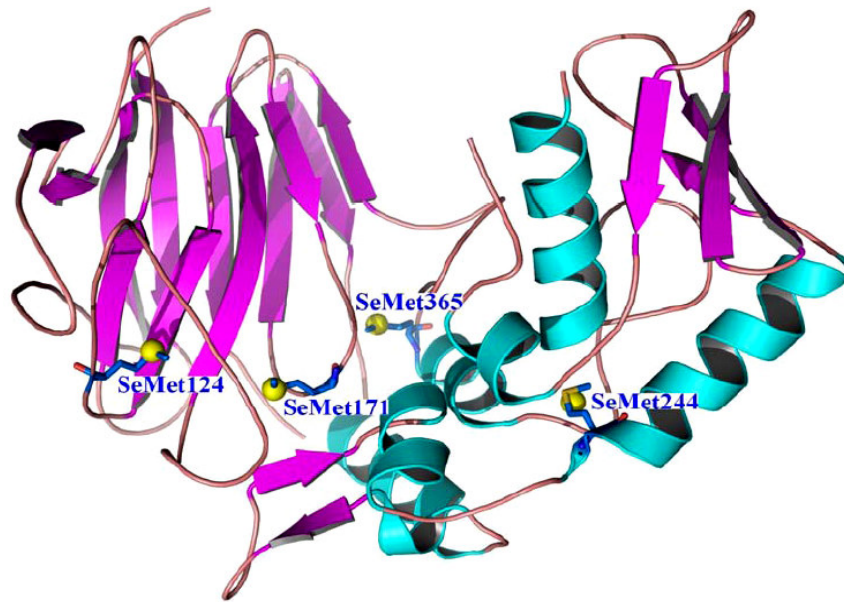


圖 7-2-3、以PyMOL軟體繪製硒化甲硫胺酸(Selenomethionine / SeMet)。
 於初步 SeMet-LPHase結構中的位置，共找到4個重原子硒(黃色圓球)的位置，分別為
 SeMet¹²⁴、SeMet¹⁷¹、SeMet²⁴⁴和SeMet³⁶⁵，其佔有率(Occupancy)分別為59 %、61 %、58 %
 和72 %。(圖自清大王雯靜老師實驗室提供)

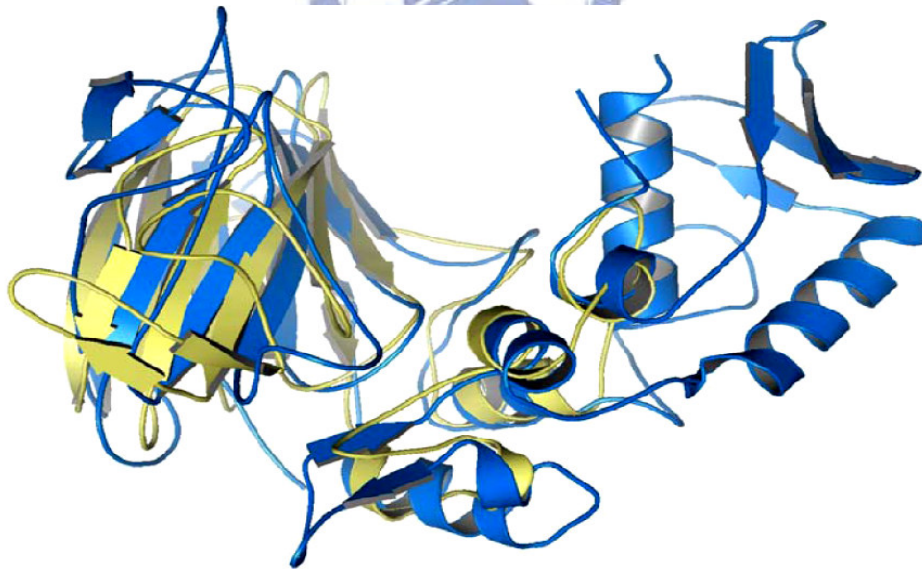
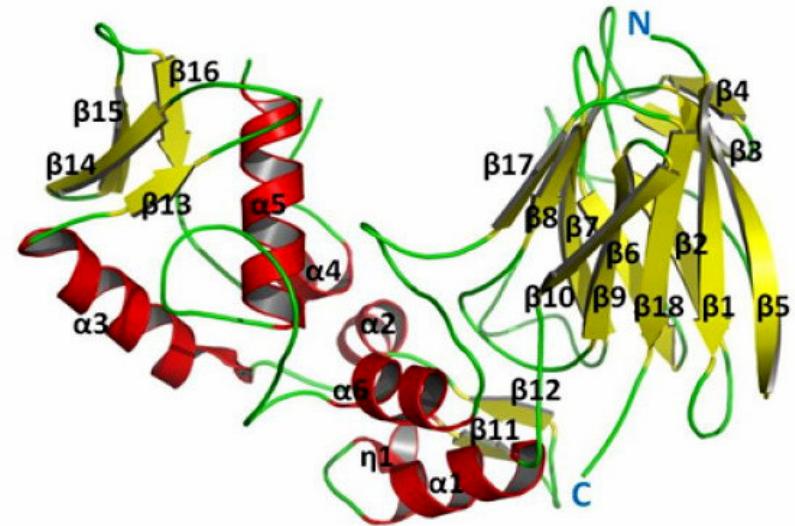
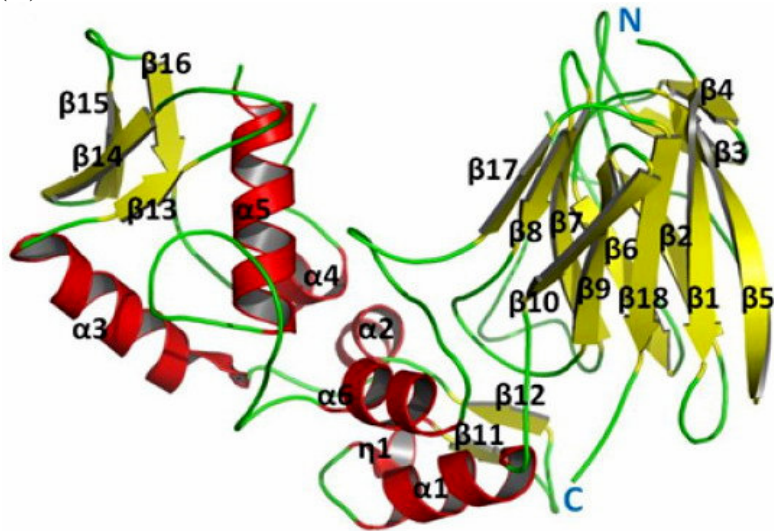


圖7-2-4、LPHase酵素跟甜味蛋白 (sweet tasting protein) Thaumatin 結構的疊置
 (superposition)情形。

卡通圖(Cartoon representation)為LPHase和Thaumatin兩結構在β-桶狀區域極為類似，比
 對112個 C_α原子的 r.m.s.d.為 2.004 Å。(藍色:LPHase 蛋白質結構。黃色:Thaumatin 蛋
 白質結構，PDB: 1THV)(圖由 PyMOL 軟體繪製而成)

(A)



(B)

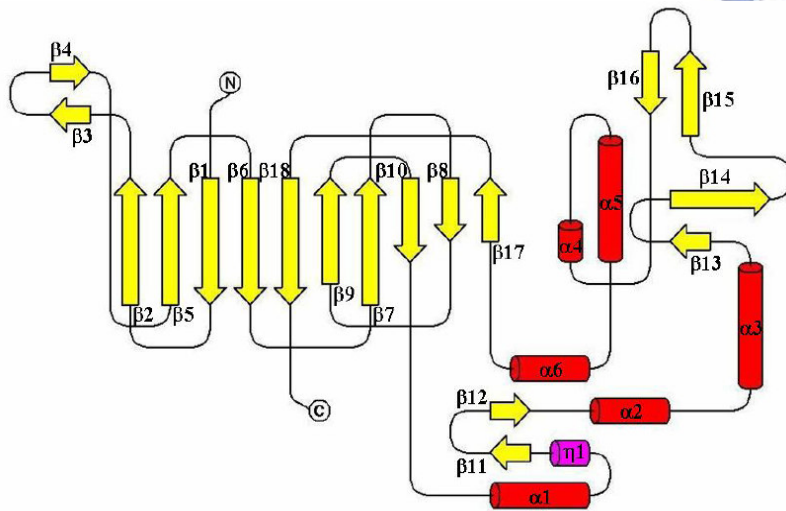


圖 7-2-5、LPHase 酵素之 (A)蛋白質晶體結構與 (B)結構之拓模圖(topology)。

LPHase 最終三級結構的折疊構型，以平面立體示意圖 (Stereoview) 表示。LPHase 結構由 6 個 α -螺旋結構 ($\alpha 1$ -helix ~ $\alpha 6$ -helix)、18 個 β -平板結構 ($\beta 1$ -sheet ~ $\beta 18$ -sheet) 及 1 個 η 結構 ($\eta 1$ structure) 組成。(紅色：螺旋結構，含 α -螺旋結構及 η -螺旋結構；黃色： β -平板結構)。從拓模圖可以明顯看出蛋白質二級結構的走向。從蛋白質的 N 端沿著上下交錯折疊的 β -平板結構 ($\beta 1 \sim \beta 10$) 繞到 $\alpha\beta$ 混合區域 ($\alpha 1 \sim \alpha 6$ 、 $\beta 11 \sim \beta 16$ 、 $\eta 1$) 之後，再度回到構成 β -桶狀區域一部份的 β -平板結構 ($\beta 17$ 、 $\beta 18$)，並且終止在位於蛋白質 C 端的最後一個胺基酸 Asp401。(紅色： α -螺旋結構，黃色： β -平板結構，粉紅色： η 結構)(圖自清大王雯靜老師實驗室)。

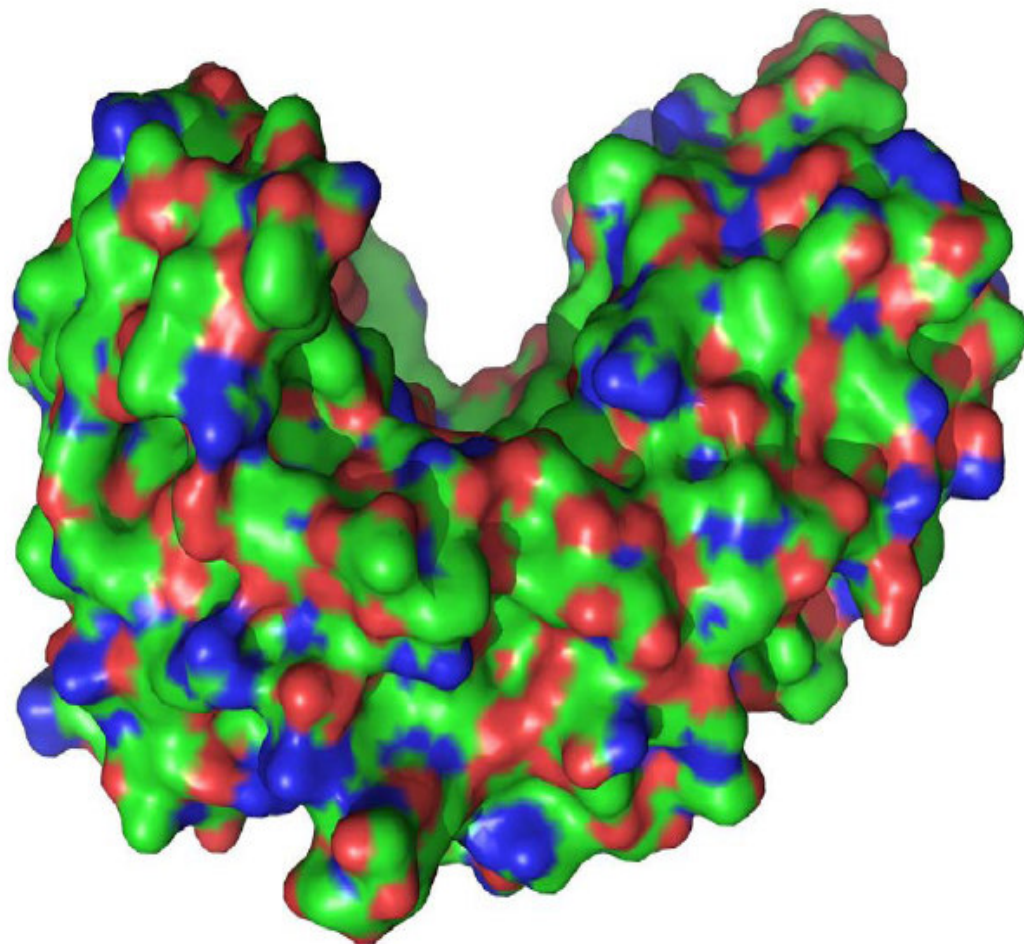


圖7-2-6、LPHase酵素結構的表面示意圖(surface representation)。

LPHase 結構屬於裂縫型 (cleft/groove) 之結構。(綠色：不帶電或疏水性(hydrophobic) 胺基酸；藍色：帶正電之胺基酸；紅色：帶負電之胺基酸)。(圖由PyMOL 軟體繪製而成)

7-2-2、 β -1,3-葡聚五糖生產水解酵素結構分析

LPHase 結構在最小不對稱單元(asymmetric unit)中存在一個蛋白質分子，含水比例(solvent content)約為 53 %，以單體(monomer)結構的形式呈 $P2_12_12_1$ 空間群堆疊而成蛋白質晶體。整體結構中包含有 6 個 α -螺旋結構(α -helix)、18 個 β -平板結構(β -sheet)及 1 個 η 結構(3_{10} 螺旋結構)；上下交錯的 β -平板結構 (up-and-down β -sheet) 形成 β -桶狀區域 (β -barrel domain)，另一部份則構成 α/β 混合區域 (α/β mixed domain) (見圖 7-2-5_A)，輔以 LPHase 結構之拓樸圖(如圖 7-2-5_B 所示)能更清楚地表示整體結構的折疊情形。從平面的觀點看出二級結構的走向， α/β -混合區域和 β -桶狀區域間形成的凹陷裂縫處，因其較小的立體空間障礙，提供受質與酵素進行催化反應的良好部位，構成了酵素催化受質 β -1,3-葡聚糖的活化中心(見圖 7-2-6)，為一傳統裂縫型(cleft/groove)的醣苷水解酵素(glycosyl hydrolase)。

綜觀整段 LPHase 蛋白質序列，僅只有 Cys³⁰⁶ 和 Cys³²⁶ 兩個 Cysteine 胺基酸，有機會形成單體內雙硫鍵(intra-subunit disulfide bonds)，又根據 LPHase 蛋白質結構顯示僅為一個單體結構，因此，並無單體間雙硫鍵(inter-subunit disulfide bonds)。而從 LPHase 結構可以得知 Cys³⁰⁶ 與 Cys³²⁶ 兩個硫原子之間的距離為 3.69 Å (見圖 7-2-7 所示)，遠大於正常雙硫鍵之鍵長 1.6 ~ 2.4 Å，因此，可以確定正常的 LPHase 蛋白質結構中並無雙硫鍵的存在。也正說明於外加 Hg²⁺ 之重金屬時，會和自由的 Cysteine 作用鍵結，破壞蛋白質結構，造成 LPHase 的催化作用失活。

根據 PROCHECK 程式判斷的不允許區域 (disallowed region) Arg³⁰⁸ 位於 $\alpha 4$ 跟 $\alpha 5$ 兩 α -螺旋結構間的一個小轉彎處(Turn)，共有 5 個水分子 H₂O 可以與之形成氫鍵 (hydrogen bond)，分別為 Arg³⁰⁸N-Wat¹³¹ (2.91 Å)、Arg³⁰⁸NH1-Wat¹⁷⁹ (2.94 Å)、Arg³⁰⁸NH2-Wat³³⁴ (3.19 Å)、Arg³⁰⁸O-Wat³⁸⁰ (2.78 Å) 以及 Arg³⁰⁸O-Wat⁷⁰⁹ (3.16 Å)，(見

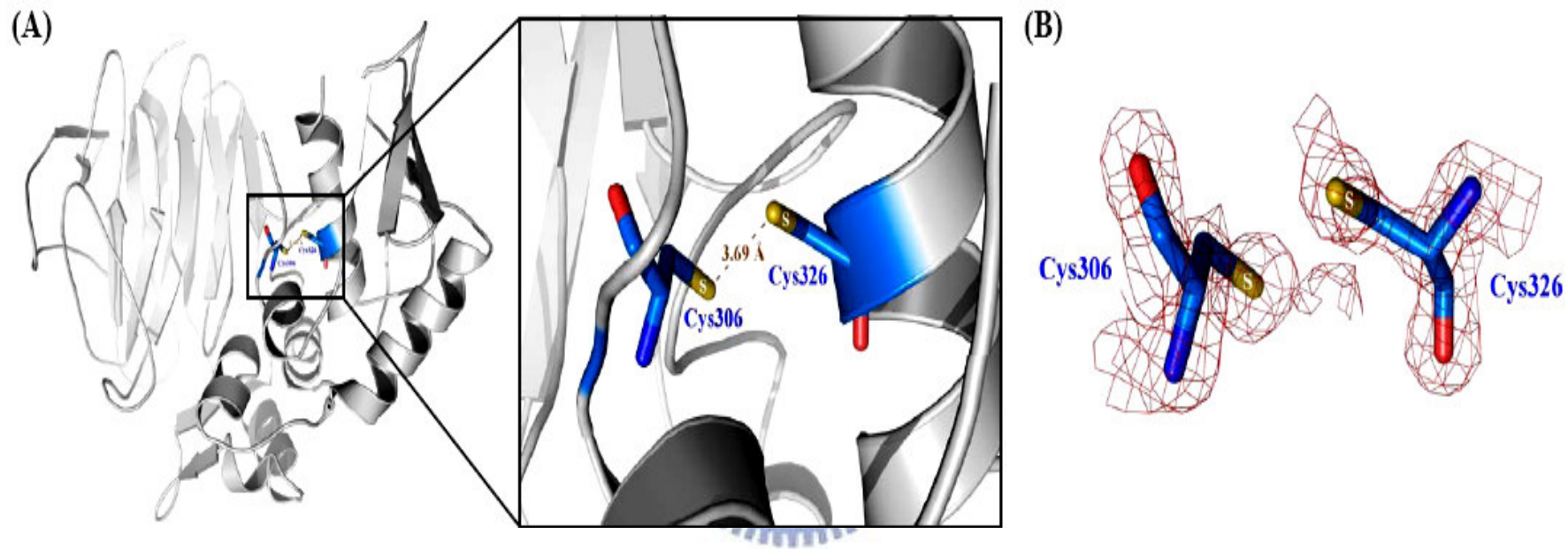


圖7-2-7、LPHase酵素晶體結構中兩胺基酸Cysteine的位置。

(A) 整段LPHase 蛋白質中僅含有Cys³⁰⁶和Cys³²⁶兩個Cysteine，而雙硫鍵(disulfide bond)間之距離約在1.6 ~ 2.4 Å 之間，顯然Cys³⁰⁶-Cys³²⁶間硫原子的距離3.69 Å已大於2.4 Å，不符合正常之雙硫鍵鍵長，故排除LPHase酵素中蛋白質晶體存在有雙硫鍵的可能。(B) Cys³⁰⁶和Cys³²⁶之 $2F_o - F_c$ 電子雲圖(1.5 σ)，顯示兩者之間的距離太遠，無法形成雙硫鍵之鍵結。(圖自清大王雯靜老師實驗室提供)

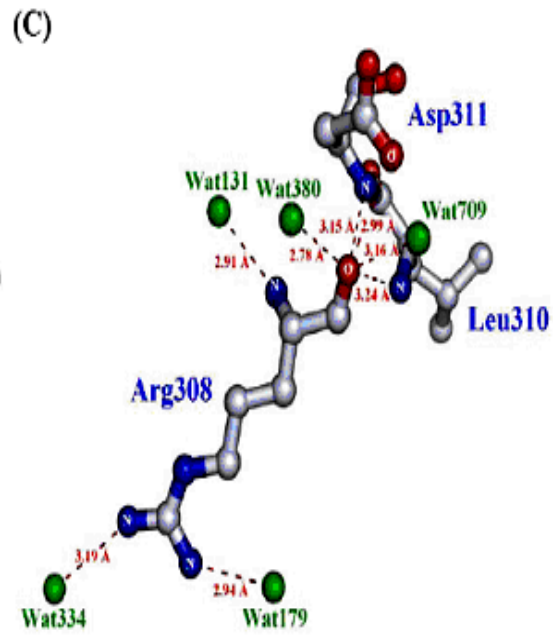
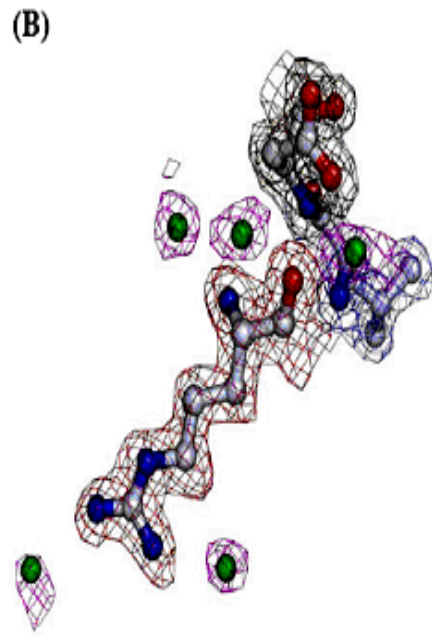
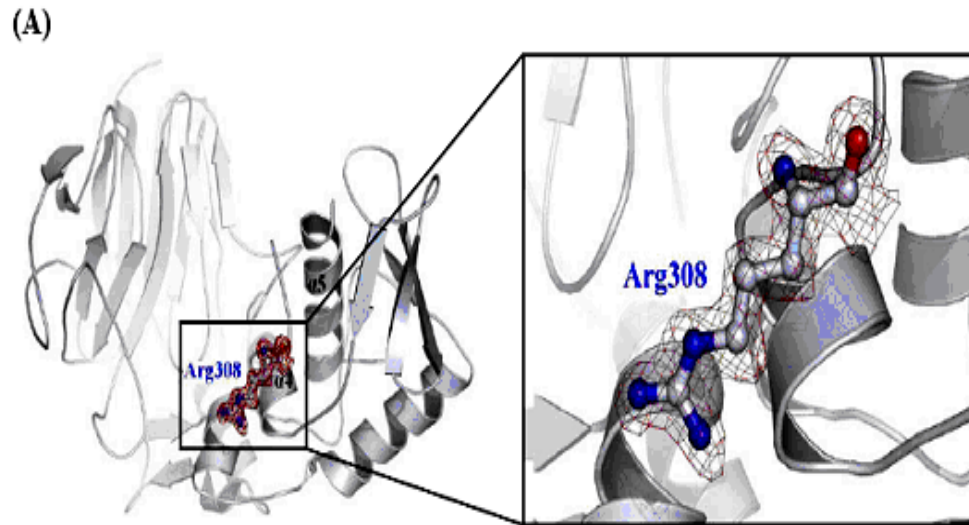


圖7-2-8·LPHase酵素結構在 Ramachandran Plot 屬不允許區域(disallowed region)的胺基酸Arg³⁰⁸。

(A) 不允許區域 Arg³⁰⁸位於 LPHase 結構中的空間位置。Arg³⁰⁸位在 α 4-螺旋結構和 α 5-螺旋結構之間的轉彎處(turn)，主鏈及支鏈都合理地放置在電子雲內。(B) Arg³⁰⁸周圍附近水分子及胺基酸殘基(Leu³¹⁰、Asp³¹¹)之電子雲分佈情形。(C) Arg³⁰⁸與周圍可能形成氫鍵的原子間距離。(圖自清大王雯靜老師實驗室提供)

圖 7-2-8 所示)。藉由這些氫鍵來穩定此不允許區域，電子雲的分佈清晰可見，Arg³⁰⁸ 之分子模型骨架能適切地放置入電子雲圖中，已可視為一合理的分子模型結構。觀察發現 LPHase 結構僅由 A chain 構成，367 個胺基酸(不包括訊號勝肽的 35 個胺基酸)中，共有 362 個胺基酸已建構完成，但缺少供轉譯起始的 Met¹，以及 Ala³⁶、Asn³¹⁴、Asp³¹⁵、Gln³¹⁶ 等 5 個胺基酸，此部分的殘基尚未被建構，在 2F_o-F_c 的電子雲圖中看不見這些殘基的電子雲分布，推測可能是因為光靠 4 個硒原子去尋找相位，要建構全長 367 個胺基酸，平均一個硒原子就得建構 90 個左右的胺基酸，能建構出 98.6 % (362/367) 的分子模型，幾乎已經達到極限了；亦有可能是這些尚未建構的胺基酸處於較不穩定的狀態，位在環狀(loop)區域，具高度柔軟彈性(flexible)，原子過度擾動的結果，導致電子雲圖模糊不清，無法清楚地被辨識。因此，位於 LPHase 蛋白質 N 端，以及介於 $\alpha 4$ 跟 $\alpha 5$ 兩 α -螺旋結構間之胺基酸依然無法呈現在最終的蛋白質結構中。



3-2-3、 β -1,3-葡聚五糖生產水解酵素類似結構之探討

解讀完成之 LPHase 晶體結構與 GH-5、16、17 三個家族有迥然的不同，其結構由一上下交錯的 β -平板結構，所形成 β -桶狀區域(β -barrel domain)，與另一部份 α/β -混合區域 (α/β mixed domain) 所構成之組成，將此兩區域分別送到 Dali Server (<http://www.ebi.ac.uk/dali/>) 進行結構同源性的比對， α/β -混合區域在 Protein Data Bank (<http://www.wwpdb.org/>) 的 9,005 個蛋白質結構中並未有類似折疊構型的已知結構；而在 β -桶狀區域的比對情形找到 121 個可能的類似結構，包括 PDB 資料庫編號：1THV、1YHP-A、1IAZ-A... 等結構 (附錄 XVI 之表)。當以 LPHase 酵素完整之 α/β -混合區域和 β -桶狀區域之結構進行比對後的結果，可發現 1THV 遠高於其餘的 17 個可能結構，而此結果亦符合 β -桶狀區域的比對情形，可知 1THV 結構跟 LPHase 酵素結構具高度相似，且相似的部份位於 LPHase 酵素結構的 β -桶狀區域。根據上述比對的結果，將 LPHase 結構和 1THV 結構(來自 *Thaumatococcus daniellii* 的甜味蛋白 Thaumatin)⁽²¹⁵⁾ 互相疊合 (superimpose) 後，(見圖 7-2-4 所示)，發現結構的確如預期地在 β -桶狀區域具有高度相

似。就三級結構的比對而言，此甜味蛋白Thaumatococcus (Protein Data Bank code, 1THV) 主要類似於LPHase酵素結構中 β -桶狀區域，涵蓋一小部份的 α -螺旋結構，但分析其蛋白質序列，發覺兩個蛋白質的相似程度僅有18.3%，幾乎沒有任何具有意義的保守區域存在，可見雖然兩蛋白質在演化上並無太大關係的情況下，其蛋白質三級結構的折疊方式還是極有可能有類似的情況。

Thaumatococcus 甜味蛋白屬低熱量的增甜劑(sweetener)，可被用來當做調味增強劑(flavor enhancer)使用，為水溶性且熱穩定的蛋白質，可穩定地存在於酸性的環境之中，從西非植物 *Thaumatococcus daniellii* Bennett) 提煉萃取而來，包含 Thaumatococcus I 和 Thaumatococcus II 兩個主要蛋白質。體外(in vitro)實驗的研究發現，許多 Thaumatococcus 蛋白家族 (Thaumatococcus protein family) 成員展現抑制真菌菌絲生長 (hyphal growth) 和孢子形成 (sporulation) 的特性，屬對抗病原菌的反應蛋白 (pathogen-response protein domain)⁽²¹⁶⁻²¹⁸⁾。而在Thaumatococcus的蛋白結構中，更具有與 β -1,3-葡聚糖強烈相互結合作用的鍵結次單位區域(binding subsit)⁽²¹⁹⁾。推測LPHase蛋白結構中， β -桶狀區域亦對 β -1,3 糖苷鍵之葡聚糖有強交互鍵結作用；同樣可分解位於真菌細胞壁上複雜性之 β -1,3-葡聚糖結構，導致真菌細胞壁的破壞，影響真菌的各種生理特性。

雖然於家族GH-64中，尚未有其他任何蛋白質晶體結構被解析出，無法精確的區別各酵素催化中心結構彼此之間的差異。但根據我們所建構之LPHase蛋白質結構，進行對家族GH-64中其他糖苷水解酵素序列之間，各保守區域的二級結構預測，這將有利於家族GH-64中其餘蛋白質的結構建立與催化殘基位置的鑑定。首先，將家族GH-64中各菌種 β -1,3-葡聚糖水解糖苷酵素之蛋白質進行多重序列比對(比對結果摘錄於**附錄XVI**)，結果發現*Oerskovia xanthineolytica*、*Arthrobacter sp.* YCWD3兩菌株以及同為*Streptomyces*屬的其他生物來源菌，所生產的 β -1,3-葡聚糖水解糖苷酵素與成熟蛋白LPHase的胺基酸序列有高達70~85%相似程度。隨後我們從比對結果中，選擇蛋白質序列相似度達40%以上的生物菌種，進行這些 β -1,3-葡聚糖水解糖苷酵素的序列

中，所可能呈現二級結構區域之模擬、預測，見圖7-2-9所示。從圖中可發現，這些與LPHase蛋白序列極高相似之 β -1,3-葡聚糖水解醣苷酵素，所呈現各二級結構區域裡的胺基酸序列上，亦有著高度的保留相同性(紅色區塊)，其意謂著這些生物來源菌種所生產之 β -1,3-葡聚糖水解醣苷酵素結構上亦可能有極類似的折疊型態。從過去這些*Streptomyces*屬的生物菌種之 β -1,3-葡聚糖水解醣苷酵素所提供的研究文獻，卻無法像LPHase酵素可專一水解生產 β -1,3-葡聚五糖產物。我們試圖比較所有*Streptomyces*菌種來源之 β -1,3-葡聚糖水解醣苷酵素，位在催化中心表面結構與受質糖作用的各胺基酸側鏈組成是否有所極大差異？而從初步的受質糖-酵素的複合體電子雲圖可觀測到，反應受質糖分子結構位於酵素凹型裂縫結構區域中(見圖7-2-10所示)。因此，我們藉由PyMOL軟體與圖7-2-9中二級結構區域模擬、預測之結果，觀察搜尋LPHase酵素所構成凹型裂縫之表面區域 α 2、 α 4、 α 5、 α 6、 β 7、 β 8、 β 10、 β 12、 β 17的二級結構中，有51個位置之胺基酸組成與受質 β -1,3-葡聚糖，可能有著作用不等的氫鍵鍵結引力存在，隨後將這51個位置之胺基酸比對其他*Streptomyces*菌種來源的 β -1,3-葡聚糖水解醣苷酵素序列，發現這些位置胺基酸中有19個(紅色標示位置之胺基酸)在凹型裂縫結構表面序列中，為高度保留的胺基酸，但所佔比例並不高，見圖7-2-11所示。因此，推測猜想可能為其他不同之胺基酸(藍色標示位置之低保留度的胺基酸)，造成構成之催化結構區域改變，造成與受質 β -1,3-葡聚糖作用有所差異，使得水解產物無法像LPHase酵素有如此高專一性。另有一為酵素與受質糖的持續性(processivity)作用假說⁽²²⁰⁾，當長鏈 β -1,3-葡聚糖進入酵素催化結合次單位，進行催化水解作用後，水解完的還原端產物隨之離開，而此時非還原端直鏈糖與酵素可能因作用引力影響，並未分離，使非還原端直鏈糖依序進入酵素催化結合次單位進行似外切型(exo-type)酵素水解反應，因此，得到專一特定的 β -1,3-葡聚五糖產物。

從LPHase蛋白質結構雖為一傳統內切裂縫型(endo/groove)結構的醣苷水解酵素(glycosyl hydrolase)，但卻有專一性的 β -1,3-葡聚五糖產物之水解酵素；我們試圖將各家族醣苷水解酵素中，分屬類似此型態蛋白質結構的醣苷水解酵素列舉出其一，

並相比較，見圖7-2-12與表7-2-1，各家族糖苷酵素之基質結合部位皆呈現一狹長開口裂縫型(open-groove)的作用區域；但不同酵素催化作用區域有著不同的受質結合次單位(binding subsuit)，使催化水解之產物有二至四長度不等的寡糖。從圖7-2-12中，各家族糖苷酵素蛋白質結構綜合觀之，LPHase酵素晶體表面以loop-結構(棕色)將 α -螺旋結構、 β -平板結構包覆於內所架構而成，與其他糖苷酵素蛋白質晶體表面 α -螺旋結構、 β -平板結構和loop結構穿插的架構，迥然不同。量測 LPHase酵素晶體之凹口裂縫兩側平均間距為20~25 Å，遠大於其他同為內切裂縫型的糖苷水解酵素，其裂縫兩側的間距大約在10~18 Å不等，推測可能因素為：受所鍵結的反應受質聚糖結構的影響，在GH-5、GH-6、GH-7、GH-8、GH-9、GH-19、GH-28、GH-46和GH-53等糖苷水解酵素中，可發現受質聚糖是以 α 或 β -1,4鍵結之直線平板型構造為主，為了能與受質聚糖間有最佳氫鍵結合作用力，致使這些酵素催化中心的作用區域呈現狹窄而長結構。對LPHase酵素晶體結構而言，我們推測可能因 β -1,3-葡聚糖卡德蘭膠(curdlan)為一長鏈螺旋型構造，為使這螺旋結構的受質聚糖與酵素的催化中心區域有絕佳之氫鍵結合作用力，致使LPHase酵素活性中心結構演化成大開口的內切裂縫型糖苷水解酵素。因此，對酵素催化水解速率而言，不再只受活化中心蛋白結構影響，反應受質的結構構形亦扮演另一重要角色。

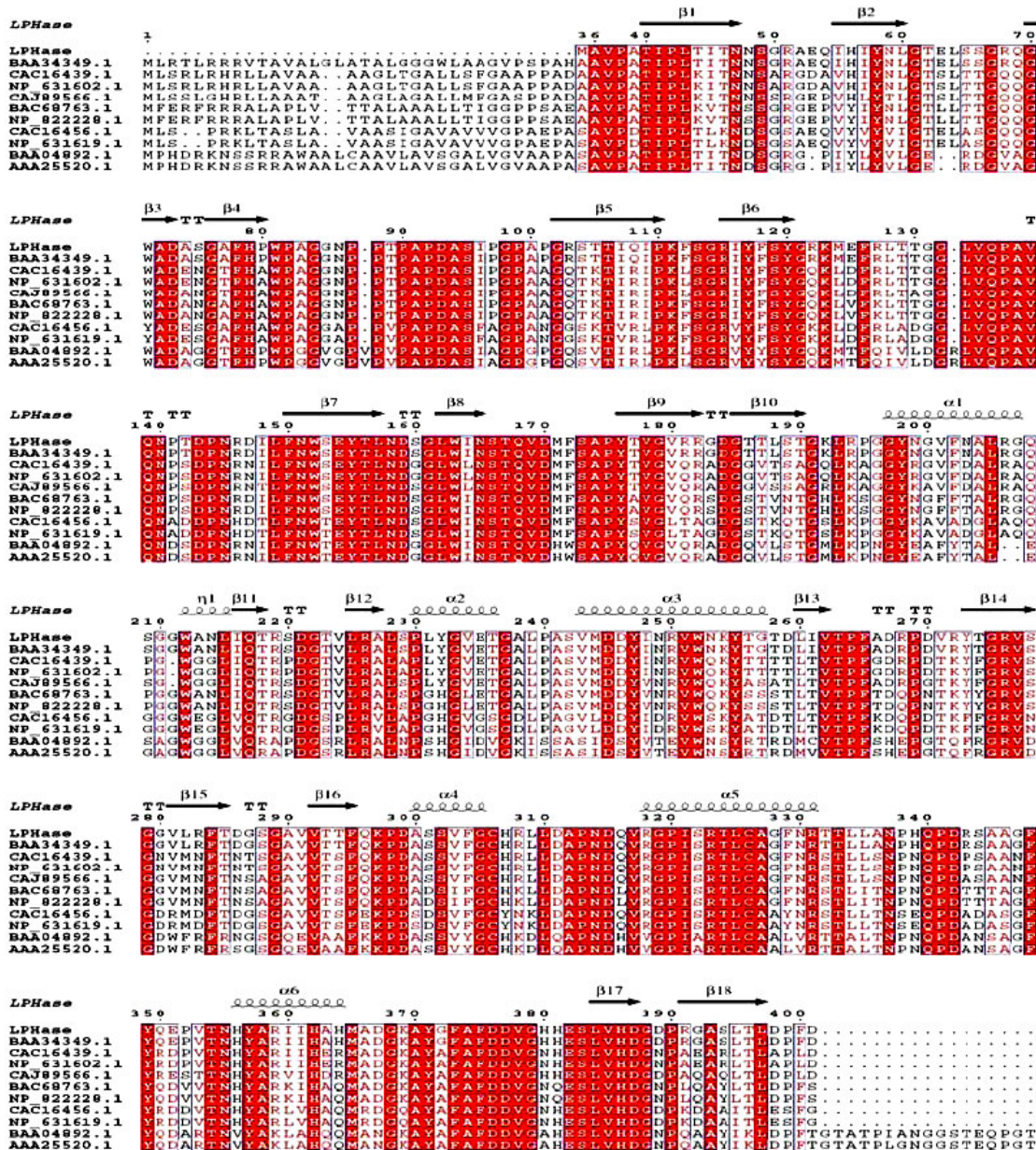


圖7-2-9、依據解出之LPHase 蛋白質結構來預測糖苷水解酵素第64號家族序列相似度達40%以上之蛋白質二級結構。

LPHase：承接圖7-2-9的LPHase晶體之二級結構分佈（ α 為 α -螺旋結構， β 為 β -平板結構， η 為 3_{10} 螺旋結構，T 為彎曲的圈環結構），LPHase：人造LPHase基因之蛋白質序列（不包括訊號肽的35 個胺基酸，且外加一個轉譯起始胺基酸Methionine）。
 BAA34349.1： *Streptomyces matensis* 菌株的Laminaripentaose-producing β -1,3-gluconase (LPHase)，CAC16439.1： *Streptomyces coelicolor* A3(2) 菌株的putative secreted sugar hydrolase，NP_631602.1： *Streptomyces coelicolor* A3(2) 菌株的secreted sugar hydrolase，CAJ89566.1： *Streptomyces ambofaciens* ATCC 23877 菌株的putative secreted sugar hydrolase，BAC68763.1： *Streptomyces avermitilis* MA-4680 菌株的putative sugar hydrolase，NP_822228.1： *Streptomyces avermitilis* MA-4680 菌株的sugar hydrolase，CAC16456.1： *Streptomyces coelicolor* A3(2) 菌株的putative secreted hydrolase，NP_631619.1： *Streptomyces coelicolor* A3(2) 菌株的secreted hydrolase，BAA04892.1： *Arthrobacter* sp. YCWD3 菌株的 β -1,3-gluconase (Glc1)，AAA25520.1： *Cellulosimicrobium cellulans* 菌株（或稱*Oerskoviaxanthineolytica* 菌株）的 β -1,3-gluconase。胺基酸編號依據BAA34349.1(LPHase)蛋白質全長序列而定（深紅色區塊為蛋白質序列中完全保守之胺基酸）。（此分析數據自清大王雯靜老師實驗室提供）

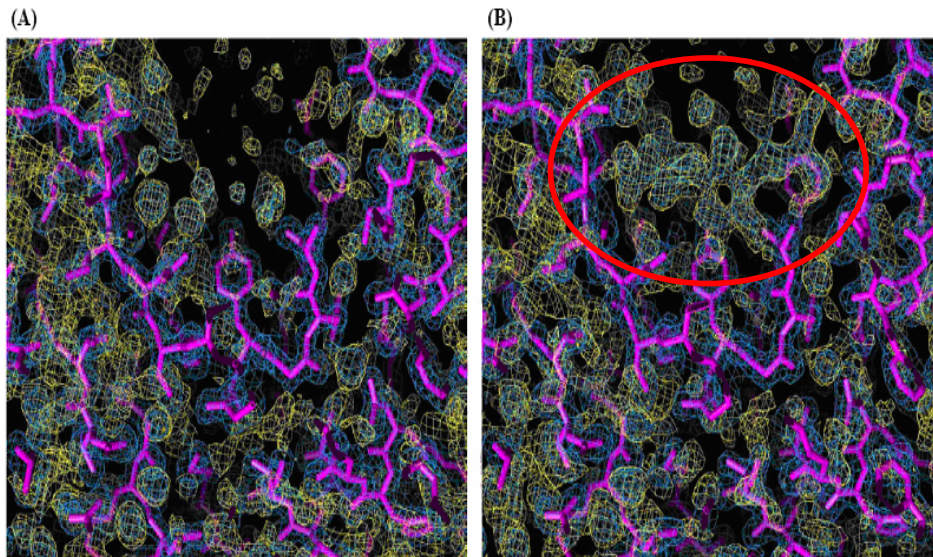


圖 7-2-10、LPHase 電子雲圖與 LPHase-糖苷受質複合體電子雲圖的比較。

(A) LPHase 電子雲圖，(B) LPHase-糖苷受質之複合體電子雲圖，顯示受質糖苷分子結構，介於 α/β -混合區域和 β -桶狀區域之間的凹陷裂縫處，除了蛋白質電子雲的訊號外，尚有類似受質糖苷分子電子雲的分佈(1.5 σ)，推測此訊號所在的位置為酵素進行催化作用的活化中心，而其附近的胺基酸則可能為重要的催化殘基。(藍色：2F₀-F_c 電子雲圖，黃色：F₀-F_c 電子雲圖)(圖由 PyMOL 軟體繪製並自清大王雯靜老師實驗室提供)

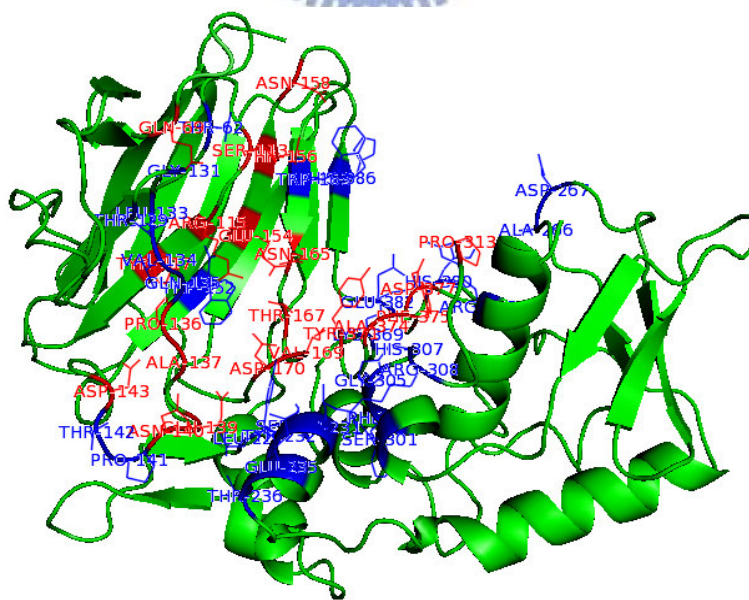
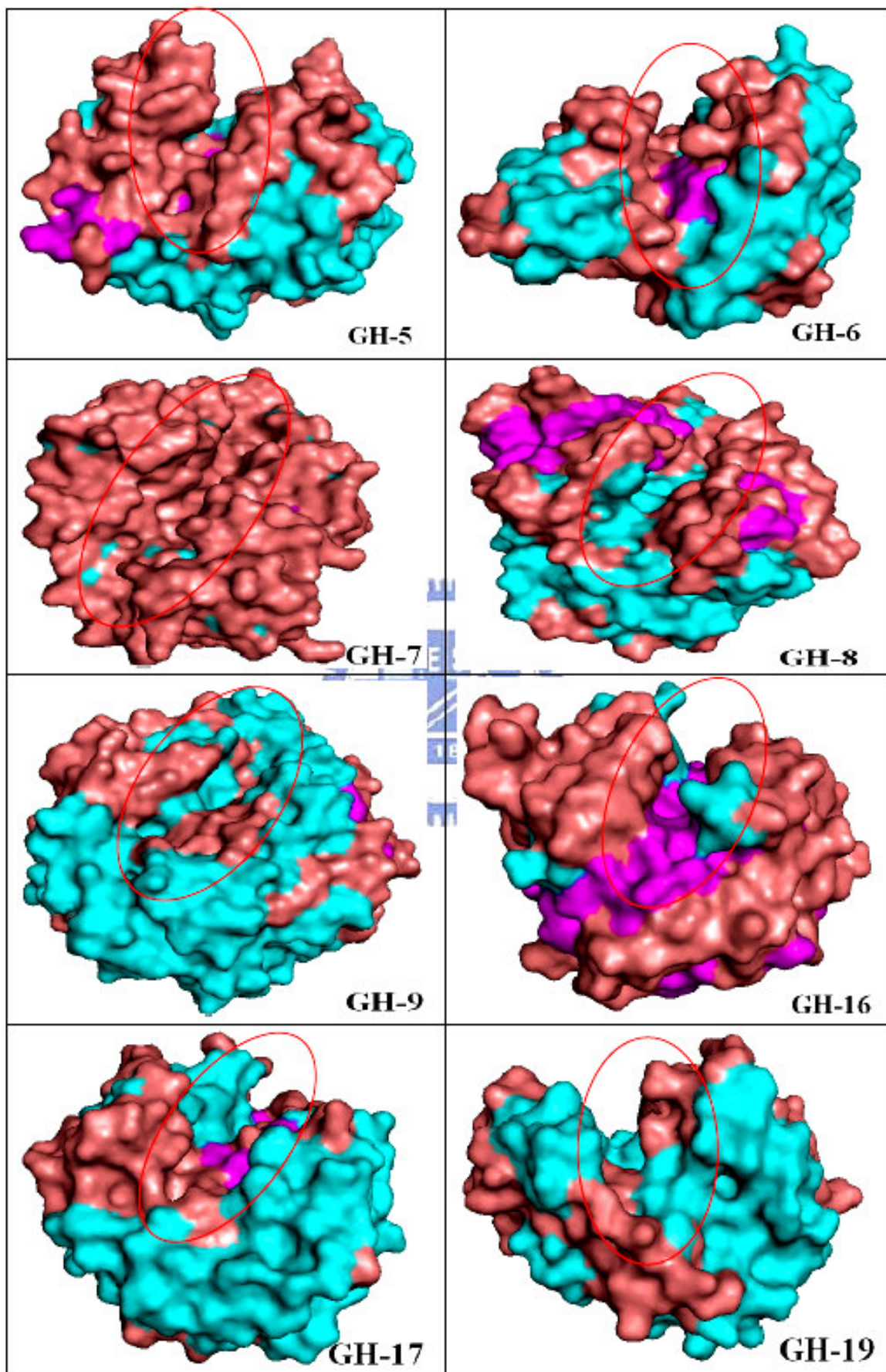


圖 7-2-11、預測 LPHase 酵素晶體，在凹型裂縫表面的二級區域結構中與受質糖可能有引力作用之胺基酸位置。(圖由 PyMOL 軟體繪製)



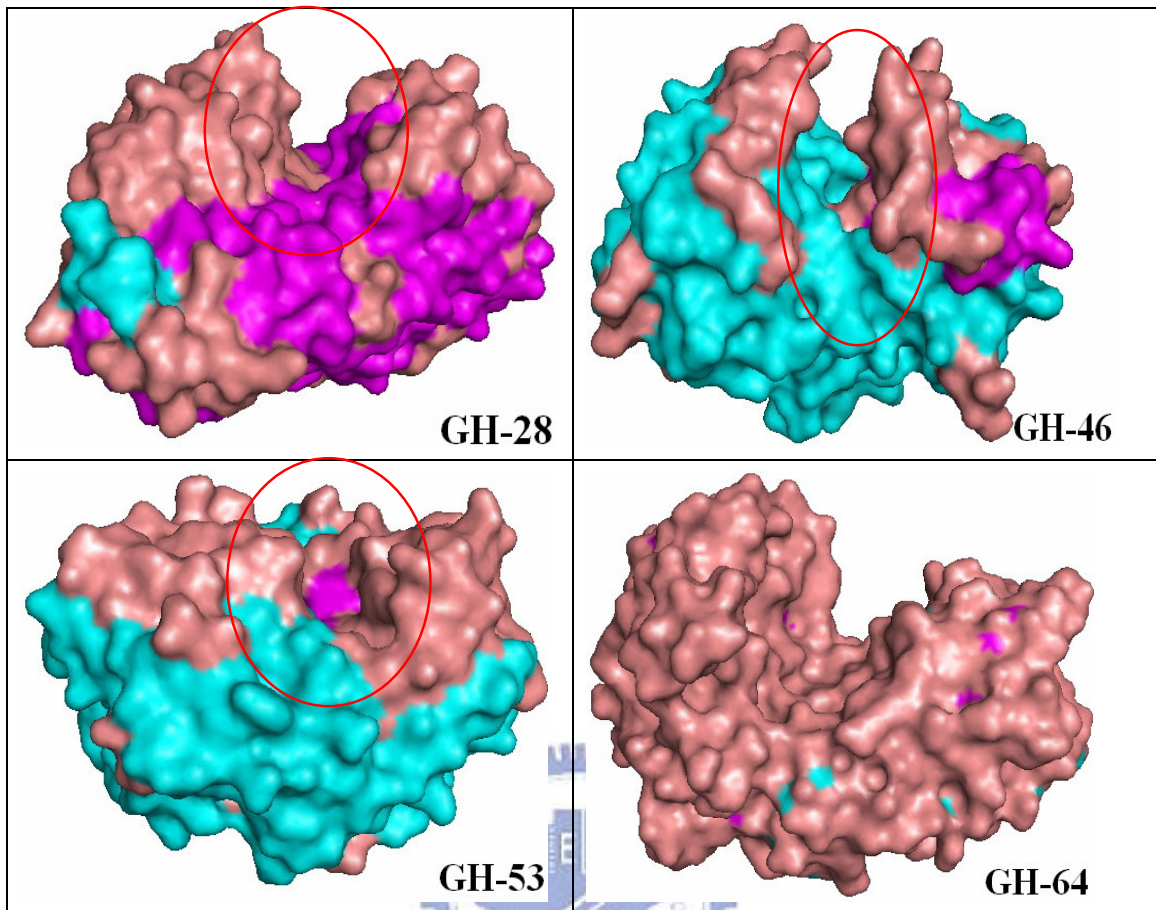


圖 7-2-12、糖苷水解酵素家族中，分屬內切型裂縫結構糖苷水解酵素之催化中心結構比較。(棕色為 loop 結構，青藍色為 α -螺旋結構，紫色為 β -平板結構)

表 7-2-1、為承接圖 7-2-12 中，各糖苷水解酵素家族結構之酵素名、菌種來源、PDB 號碼、作用受質結構與產物。

Glycoside hydrolase family	enzyme	Organism	PDB number	Structure of substrate	Clans of enzyme structure	Hydrolysis products
GH-5	Endo-mannanase	<i>Thermotoga maritima</i>	1VJZ	[Man-β-1,4-Man] _n	Clans-A , (α/β) ₈	二、三、四糖
GH-6	Endo-1,4-glucanase	<i>Thermobifida fusca</i>	2BOF	[Glc-β-1,4-Glc] _n		二、三糖
GH-7	Endo-1,4-glucanase I	<i>Fusarium oxysporum</i>	3OVW	[Glc-β-1,4-Glc] _n	Clans-B , β-jelly roll	二糖
GH-8	Endo-xylanase	<i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i>	1XW2	[xyl-β-1,4-xyl] _n	Clans-M , (α/α) ₆	二、三糖
GH-9	Endo-1,4-glucanase	<i>Nasutitermes takasagoensis</i>	1KS8	[Glc-β-1,4-Glc] _n		二糖
GH-16	Lichenase (β-1-3,4- glucanase)	<i>Bacillus licheniformis</i>	1GBG	[Glcβ-1,4Glcβ-1,4Glcβ-1,3Glc] _n	Clans-B , β-jelly roll	三、四糖
GH-17	Endo-1,3-glucanase	<i>Musa acuminata</i>	2CYG	[Glc-β-1,3-Glc] _n [[Glc-β-1,3-Glc] _m -β-1,6-Glc] _n	Clans-A , (α/β) ₈	二、三糖
GH-19	Chitinase	<i>Streptomyces coelicolor A3</i>	2CJL	[GlcNAc-β-1,4-GlcNAc] _n		二糖
GH-28	Endo-polygalacturonase	<i>Chondrostereum purpureum</i>	1KCC	[Galturon-β-1,4-Galturon] _n	Clans-N , β-helix	二、三、四糖
GH-46	Chitosanase	<i>Bacillus circulans</i>	2D05	[GlcN-β-1,4-GlcN] _n	Clans-I , α + β	二、三、四糖
GH-53	Endo-1,4-glucanase	<i>Aspergillus aculeatus</i>	1FHL	[Glc-β-1,4-Glc] _n	Clans-A , (α/β) ₈	二、三糖
GH-64	LPHase	<i>Streptomyces matensis DIC-108</i>		[Glc-β-1,3-Glc] _n		五糖

(表整理自 CAZY database : <http://www.cazy.org/fam.html>)

7-2-4、蛋白質結構中對重要殘基與酵素-糖苷受質鍵結水解模式的判定研究

根據文獻報導，得知 LPHase 酵素催化機制隸屬於反轉機制，且於前面章節亦描述以古典酵素動力學及化學活性復活...等研究方法，初步鑑定出此酵素催化重要殘基為兩酸性胺基酸 Asp¹⁷⁰(D170)或 Glu¹⁵⁴(E154)。針對家族 GH-64 糖苷水解酵素(Family GH-64)之蛋白質多重序列比對結果，將 LPHase 蛋白質中完全保留度的 Asp¹⁴³ (D143)、Glu¹⁵⁴ (E154)、Asp¹⁷⁰ (D170)、Asp³⁷⁶ (D376)及 Asp³⁷⁷ (D377)等 5 個酸性胺基酸，標示於蛋白質晶體的相對位置上；發現這些殘基皆位於酵素，由 β -桶狀與 $\alpha\beta$ -混合兩區域所架構而成的凹陷裂縫之活化中心裡，見圖 7-2-13 所示。尋找 LPHase 蛋白結構中符合前述兩要件的催化殘基，觀察各殘基在蛋白晶體結構的相對位置上，可明確排除位於凹陷裂縫之活化中心外的胺基酸 Asp¹⁴³；其餘 4 個胺基酸皆位於裂縫口附近，都有可能為酵素之催化殘基。但從結構的表面示意圖(見圖 7-2-13_B 所示)，可以發現胺基酸 Asp³⁷⁶ 之側鏈並未暴露在蛋白質催化中心區域表面上，且動力學反應速率數據結果，Asp³⁷⁶ 之突變株酵素對膠狀卡德蘭膠與合成之糖苷受質 *p*-NLPG 皆具有強烈催化活性，因此，亦不可能當作催化殘基。另外，在酵素凹陷裂縫的活化中心處，可發現兩重要催化殘基之胺基酸 Glu¹⁵⁴ 和 Asp¹⁷⁰，較偏向位於對 β -1,3-葡聚糖有強烈鍵結吸引作用之 β -桶狀區域的同一側上，而非似其他一般內切型糖苷水解酵素中，兩重要催化殘基則分別座落於凹陷的活化中心之兩側上(如圖 7-2-13_B 中，胺基酸 Glu¹⁵⁴ 與 Asp³⁷⁷ 所呈現之相對位置關係)。更由文獻中指出，在單取代反轉機制的酵素反應中，兩酸性催化胺基酸上之氧基彼此平均間距約為 $10 \pm 0.5 \text{ \AA}$ (可介於 $6.5 \sim 10.5 \text{ \AA}$)。分析 LPHase 結構，胺基酸 Glu¹⁵⁴-Asp¹⁷⁰ 兩兩彼此氧基間之平均距離為 7.04 \AA 、Glu¹⁵⁴-Asp³⁷⁷ 為 11.85 \AA 、Asp¹⁷⁰-Asp³⁷⁷ 為 15.01 \AA ，其後兩者皆不在預期的 $10 \pm 0.5 \text{ \AA}$ 範圍內(見圖 7-2-14 所示)。相同地，以 Asp³⁷⁷ 之突變株酵素，分別對合成之糖苷受質 *p*-NLPG 與膠狀卡德蘭膠，進行動力學反應速率和相對活性比分析，亦呈現不錯水解反應活性(見表

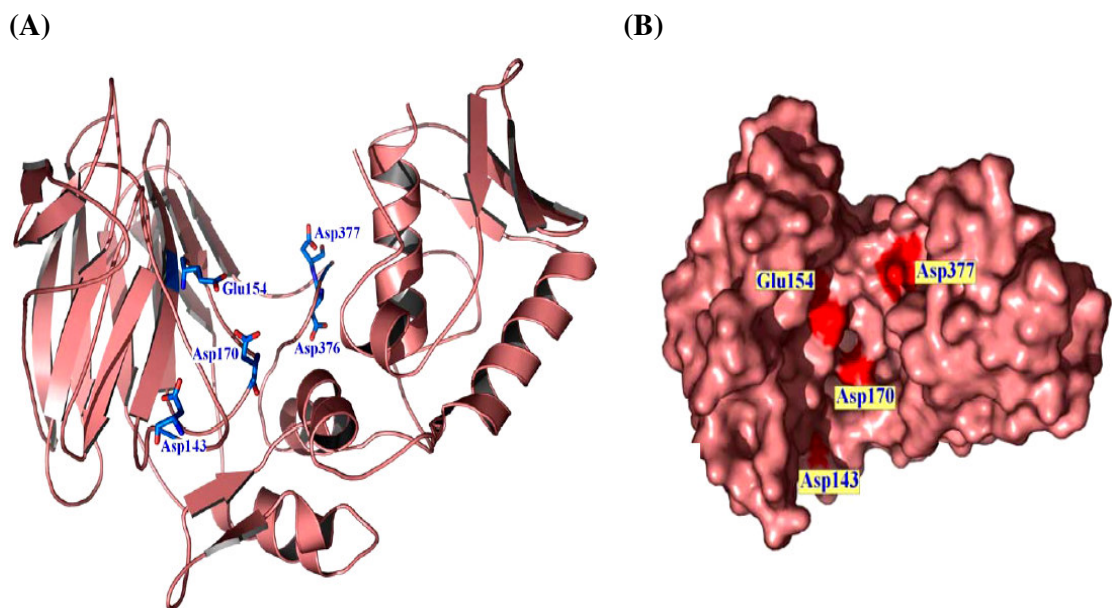


圖 7-2-13、五個保守性之酸性胺基酸 (Asp^{143} 、 Glu^{154} 、 Asp^{170} 、 Asp^{376} 、 Asp^{377}) 位於 LPHase 蛋白質三級結構中的相關位置。

(A) 卡通示意圖，(B) 表面示意圖。圖中顯示 Asp^{143} 、 Glu^{154} 、 Asp^{170} 、 Asp^{376} 及 Asp^{377} 等 5 個保守性殘基，可以發現 Asp^{376} 被包圍在蛋白質內部，並未暴露於蛋白質表面，且 Asp^{143} 位於凹陷裂縫處外側，僅 Glu^{154} 、 Asp^{170} 和 Asp^{377} 三個酸性胺基酸處於活化中心區域。(圖由 PyMOL 軟體繪製而成)

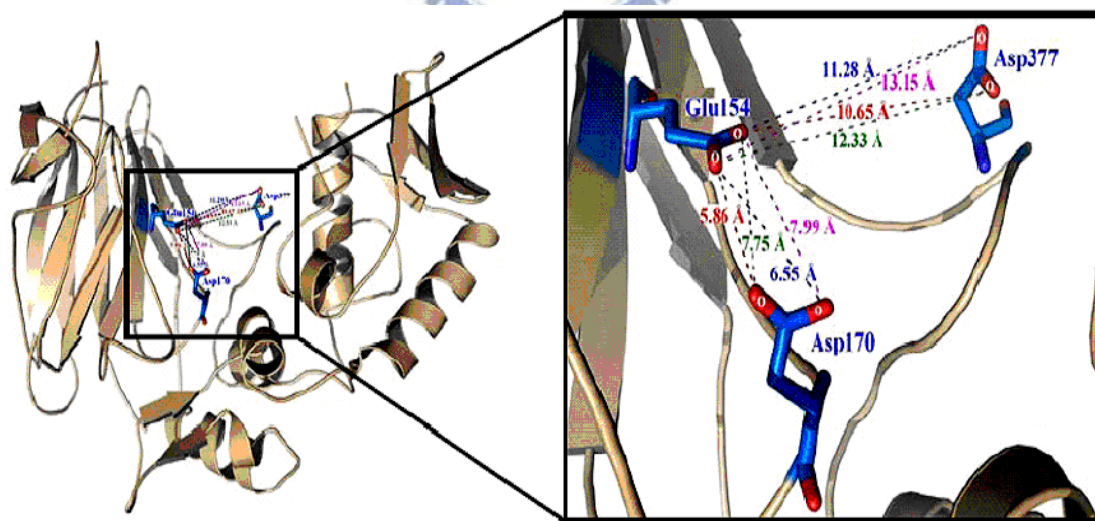


圖 7-2-14、預測催化活性殘基 Glu^{154} ，分別與 Asp^{170} 和 Asp^{377} 各氧基間相互距離。

LPHase 結構： Glu^{154} 和 Asp^{170} 間最遠為 7.99 \AA ，最近為 5.86 \AA ，平均距離為 7.04 \AA ；而 Glu^{154} 和 Asp^{377} 間最遠為 13.15 \AA ，最近為 10.65 \AA ，平均距離為 11.85 \AA 。(粉紅色虛線為最遠距離，紅色虛線為最近距離)。(圖由 PyMOL 軟體繪製而成)

7-1-5 所示)。因此，搭配蛋白質多重序列比對分析、古典酵素動力學研究和 LPHase 晶體結構等觀點，鎖定重要的催化殘基為 Glu¹⁵⁴ 及 Asp¹⁷⁰ 兩胺基酸。

藉由 β -1,3-糖苷受質與酵素所形成的複合體晶體結構，可直接觀察 β -1,3-糖苷分子與酵素結合的次單位區域，及各糖苷分子於酵素活性中心，彼此間氫鍵…等作用吸引力的胺基酸位置；而更為重要是鑑定酵素的反應催化過程和催化殘基之胺基酸位置。在糖苷-酵素複合體晶體的鑑定實驗裡，其複合體晶體的長晶與篩選過程中，困難度更多於單一 LPHase 酵素的蛋白晶體鑑定。在經過長時間與清大王雯靜老師研究室共同努力下，建構最佳的複合晶體結構模子(model)，證實 LPHase 酵素的兩重要催化殘基分別為胺基酸 Glu¹⁵⁴ 及 Asp¹⁷⁰；更進一步，檢視出受質糖苷分子在酵素活性中心的結合次單位區域與相關氫鍵作用力吸引之胺基酸位置，這些相關晶體結構和鍵結水解模式之成果，參閱我們發表於 2009 年 *J. Biol. Chem.* 國際重要生化期刊中。由複合晶體結構的鍵結結合模子，及**章節 7-1-7** 內容所描述對還原端具甲基化修飾之 β -1,3-葡聚六/七寡糖，所作酵素初始水解反應的產物分析，可推斷 LPHase 酵素水解模式，由聚糖鏈之還原端進入酵素活性催化中心，往非還原端一方，以外切形式的反轉催化機制進行水解反應。酵素催化中心內至少含五個糖苷分子以上受質結合次單位區域，而鍵結作用特徵、模式(substrate binding characters)為[$\cdots(-2), (-1), (+1), (+2), (+3), (+4), (+5)$]。

7-2-5、酵素催化中心對影響水解反應作用相關殘基位置之研究

從圖 7-1-16 之野生株 pH-profile 趨勢圖，可發現酵素活性反應的兩個 pKa 解離差值，遠大於正常一般糖苷水解酵素催化殘基胺基酸所表現的解離差距值。因此，推測在酵素的活化中心或催化反應過程中，是否位於兩重要催化殘基周圍有其他高解離度 pKa 值之胺基酸，如 Arg (R, pKa=12.5)、Lys (K, pKa=10.0)、Tyr (Y, pKa=10.1)，參與、協助了 LPHase 酵素對合成受質 *p*-NLPG 的催化作用。首先，利用 PyMOL 軟體從 LPHase 蛋白質晶體，尋找出 LPHase 蛋白質之催化中心的催化殘基團周圍含有 Arg、Lys、Tyr 三個胺基酸所對應的位置，結果發現於酵素的凹陷裂縫活化中心處，有三個胺基酸分別為 Arg¹¹⁵ (R115)、Tyr²³² (Y232)、Tyr³⁷¹ (Y371) (其他所在位置胺基酸皆遠離活化中心或胺基酸側鏈位向與催化作用無關)，見圖 7-2-15。從圖中，發現位於催化殘基 Asp¹⁷⁰ (一般鹼催化，紫色區塊) 鄰近且同側的有胺基酸 Tyr²³²、Tyr³⁷¹ (黃色區塊)；而與催化殘基 Glu¹⁵⁴ (一般酸催化，藍色區塊) 位於鄰近的胺基酸為 Arg¹¹⁵ (紅色區塊)。進一步以 PyMOL 軟體計算這三個胺基酸 Arg¹¹⁵、Tyr²³² 和 Tyr³⁷¹，與催化殘基團 Glu¹⁵⁴ 和 Asp¹⁷⁰ 側鏈上氧基彼此之間平均距離，其結果如表 7-2-2 所示。從表中發現位在活化中心凹陷裂縫底部表面的胺基酸 Tyr³⁷¹ 與胺基酸 Asp³⁷⁷ (橘色區塊) 彼此相鄰著，兩側鏈上氧基平均間距僅為 4.7 Å，但卻與兩重要催化殘基 Glu¹⁵⁴ 和 Asp¹⁷⁰ 彼此之間距分別為 8.1 和 12.6 Å (皆大於兩重要催化殘基之間距 7.0 Å)。隨後將純化之定點突變株 Y371A 酵素，依表 7-1-4 與表 7-1-5 相同反應環境條件下，對 2 % 膠狀卡德蘭膠受質進行水解反應，發現酵素催化相對殘餘活性為 84 %；而與合成 *p*-NLPG 糖苷受質所進行之動力學水解反應速率分析，所得反應速率值為： $k_{\text{cat}} = 6.2 \text{ s}^{-1}$ 、 $k_{\text{cat}}/K_m = 3967 \text{ s}^{-1}\cdot\text{M}^{-1}$ 。此突變株 Y371A 酵素所反應出的 pH-profile 趨勢圖和野生株相比較亦極相似的。推測胺基酸 Tyr³⁷¹ 可能與 Asp³⁷⁷ 作用功能相同，將含有 -OH 基團的胺基酸 Tyr 突變成非極性胺基酸 Ala，造成與反應受質糖上 -OH 基團彼此間氫鍵作用引力的改變，但對催化反應速率的直接作用卻無太大影響。

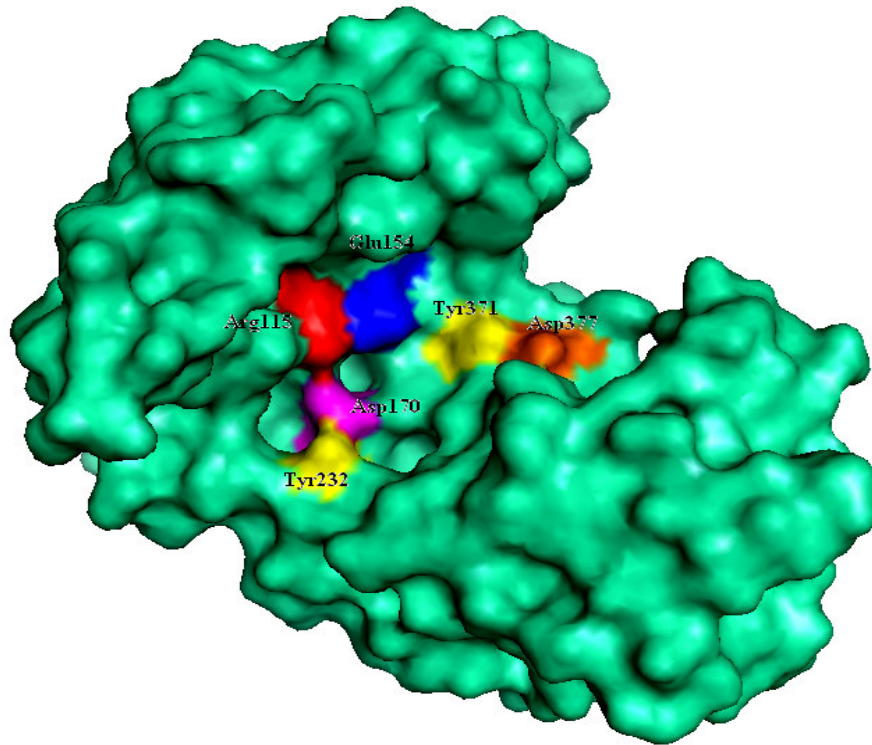


圖 7-2-15、LPHase 酵素催化中心，相關重要反應作用胺基酸位置之平面示意圖。

圖中顯示位於凹陷裂縫活化中心處，兩個重要催化殘基 Glu¹⁵⁴ (藍色區塊) 和 Asp¹⁷⁰ (紫色區塊)。可以發現有一胺基酸 Arg¹¹⁵ (紅色區塊) 位於催化殘基 Glu¹⁵⁴ 的旁邊；胺基酸 Tyr²³²、Tyr³⁷¹ (黃色區塊) 則位於催化殘基 Asp¹⁷⁰ 的同側，及胺基酸 Asp³⁷⁷ (橘色區塊)。(圖以 PyMOL 軟體繪製而成)

表 7-2-2、為承接圖 7-2-15 之 LPHase 晶體結構的各胺基酸位置中，於胺基酸側鏈末端上彼此間最短兩原子之距離。

催化殘基之胺基酸	鄰近之目標胺基酸	兩胺基酸上最短之兩原子距離
Glu154	Arg115	~ 5.3 Å
	Asp170	~ 7.8 Å
	Tyr232	~ 10.8 Å
	Tyr371	~ 8.1 Å
Asp170	Arg115	~ 6.0 Å
	Glu154	~ 7.8 Å
	Tyr232	~ 4.4 Å
	Tyr371	~ 12.6 Å

同位於酵素凹陷裂縫活化中心處的胺基酸 Arg¹¹⁵ 與 Tyr²³²，與兩重要催化殘基彼此相鄰著，且側鏈末端上最短的平均間距皆小於 7.0 Å，分別是 Arg¹¹⁵-Glu¹⁵⁴：5.3 Å 與 Tyr²³²-Asp¹⁷⁰：4.4 Å；很可能影響著在各不同 pH 反應溶液中 LPHase 酵素的催化反應作用。當以純化且二級結構與野生株相似無任何重大改變之定點突變株 Y232F 和 Y232A 兩酵素(此兩突變株酵素皆為去除胺基酸 Tyr 側鏈所含之-OH 基團)，對 2 % 膠狀卡德蘭膠受質在標準相同反應環境條件下進行水解反應，觀測發現其酵素催化反應之相對催化活性分別為 69 % 和 38 %；並於 40 °C 下，50 mM 磷酸緩衝溶液(pH 7.1) 中，與合成之糖苷受質 *p*-NLPG 進行動力學之水解反應速率分析，所得反應速率值分別為 Y232F： $k_{\text{cat}} = 5.2 \text{ s}^{-1}$ 、 $k_{\text{cat}}/K_m = 3215 \text{ s}^{-1}\cdot\text{M}^{-1}$ ；Y232A： $k_{\text{cat}} = 3.1 \text{ s}^{-1}$ 、 $k_{\text{cat}}/K_m = 1726 \text{ s}^{-1}\cdot\text{M}^{-1}$ ，均較野生株酵素為降低。造成該兩突變株 Y232F 和 Y232A 酵素催化活性下降可能之因素推測為：(1) 與受質糖上-OH 基團間氫鍵鍵結作用引力有所降低外；(2) 於相關文獻報導中有所提及⁽²²¹⁾，我們從 LPHase 酵素催化反應機制及含水分子之酵素初始 3D 晶體結構推測發現，位於胺基酸 Asp¹⁷⁰ 側鏈上吸引鍵結兩重要水分子(Asp¹⁷⁰ O_{δ2}...O Wat²³⁶：2.62 Å 和 Asp¹⁷⁰ O_{δ1}...O Wat⁴⁵⁶：2.40 Å)，當 Asp 羧酸基團於解離狀態時，造成水分子的極化作用而使其行親核性攻擊；而對相鄰僅為 4.4 Å 的胺基酸 Tyr²³² 而言，則對此水分子扮演一重要氫鍵吸引作用力角色，若當失去這輔助作用力時，會使得酵素催化反應的速率有所減緩。再者，從野生株 LPHase 酵素所呈現的 pH-profile 趨勢圖，發現為酵素之反應活性的 pKa₂ 解離值遠大於一般正常糖苷水解酵素催化殘基所表現的理論解離度。而造成第二解離度偏高的現象，推測為影響扮演提供質子化胺基酸(AH)有密切關係者。因此，這胺基酸應與 Glu¹⁵⁴ 側鏈位向相同且平行，兩側鏈上氧基之平均間距僅約為 5.3 Å 的 Arg¹¹⁵ 影響為大，而非 Tyr²³²。

我們試圖將胺基酸 Arg¹¹⁵ 以定點突變方式，分別突變成 R115K 和 R115Q 兩突變株酵素，並以和野生株 LPHase 相同培養、純化方法與條件，取得兩突變株酵素並經 SDS-PAGE 分析其純度達到 95% 以上，見圖 7-2-16_A。將純化的兩突變株 R115K 和 R115Q 酵素分別與 2 % 膠狀卡德蘭膠於標準活性測試系統中，於 37 °C 下進行 2 小時水解反應，再加入等量體積 DNS 試劑加熱反應，偵測還原糖生成量之反應活性，

其所得的相對催化活性，分別為 R115K：~0 %、R115Q：91 %；而將兩突變株酵素於 50 mM 磷酸緩衝液(pH 7.1)，40 °C 下，與受質 *p*-NLPG 進行動力學的水解反應速率分析，所得反應速率值 R115Q： $k_{\text{cat}} = 6.8 \text{ s}^{-1}$ 、 $K_{\text{m}} = 1.69 \text{ mM}$ 、 $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}} = 4023 \text{ s}^{-1}\cdot\text{M}^{-1}$ ，但 R115K 則無法觀測到 UV 吸收值的活性變化。為了了解 R115K 突變株酵素為何無催化活性？是否在蛋白質結構發生變化使得酵素活性失去，我們以 CD 光譜儀分析 R115K 突變後之酵素結構，結果如圖 7-2-16_B 所示，發現 R115K 突變株之二級結構光譜掃描圖與野生株有著很大的改變；因此，推測是酵素催化活性區結構發生改變，造成 R115K 突變株酵素失活，但為何單點突變株酵素有如此強烈改變？仍有待證明。以圓二極光譜儀 (CD) 針對 R115Q 突變株酵素之蛋白質結構分析，結果見圖 7-2-16_B，其突變株 R115Q 酵素二級結構光譜掃描圖與野生株差不多，而在 50 mM 磷酸緩衝溶液(pH 7.1)催化反應條件下，突變株 R115Q 酵素之動力學數據 K_{m} 、 k_{cat} 值和相對殘餘活性，與野生株相比較並沒有太大的變化，見表 7-1-4 與表 7-1-5。

在單取代反轉機制的 LPHase 酵素中，藉由扮演一般酸催化之胺基酸 E154 提供一質子，於醣苷氧基發生質子化(protonation)的同時亦伴隨著配醣基(aglycone)的離開而完成水解催化過程。但對解離值(pKa)為 4.2 的胺基酸 Glu，於高 pH 反應環境中，仍具有酵素催化活性，是一不合理現象。所以猜測可能於活化中心，有參與幫助催化反應過程的其他胺基酸。當將 LPHase 野生株酵素之側鏈解離值(pKa)為 12.5 的胺基酸 Arg¹¹⁵，以定點突變成不帶電荷的 Gln 後，並以章節 7-1-13 所描述之實驗方法，將突變株 R115Q 酵素，置於不同酸鹼值的緩衝液中進行催化反應，求得突變株 R115Q 反應活性之 pH-profile 曲線，結果見圖 7-2-17 所示。雖然該突變株 R115Q 酵素所呈現 pH-profile 仍為一鐘形曲線(bell-shaped curve)，但在解離值 pKa₂ 的反應特性上卻和野生株酵素的 bell-shaped curve 有著很大的改變。該突變株 R115Q 酵素在水解反應之 pH-profile 曲線上，受溶液之 pH 值所調控，使兩重要催化殘基之胺基酸產生解離作用，第一解離 pKa₁ 值約介於 5.5~6.5 間，為扮演一般鹼催化(或親核性基團)之胺基酸 D170，與野生株酵素極為相近；但對催化反應所扮演一般酸催化胺基酸之第二解離 pKa₂ 值，卻由約 10~10.5 降低至約 8.5~9。同時，亦發現胺基酸 Arg¹¹⁵ 與 Asp¹⁷⁰ 的側

鏈上氧基彼此平均間距為 6.0 Å，小於兩重要催化殘基基團上氧基平均間距 7.0 Å。在反應環境中，溶液 pH 值使扮演一般酸催化基團之胺基酸的游離或逆相質子化 (re-protonation) 的調解，對酵素催化反應活性有著重要的影響力。當移去該具解離度基團之突變株 R115Q 酵素便降低於高 pH (>9.0) 反應環境中，所表現的催化反應速率 k_{cat} 、 k_{cat}/K_m 活性值。因此，初步證據顯示鄰近於重要催化殘基 Glu¹⁵⁴ (general acid) 之胺基酸 Arg¹¹⁵ 對 LPHase 酵素的催化水解反應有著重要影響，當 LPHase 酵素於高 pH 值的溶液中，胺基酸 Arg¹¹⁵ 可當另一質子的提供者，使酵素對受質糖仍有不錯的催化活性。

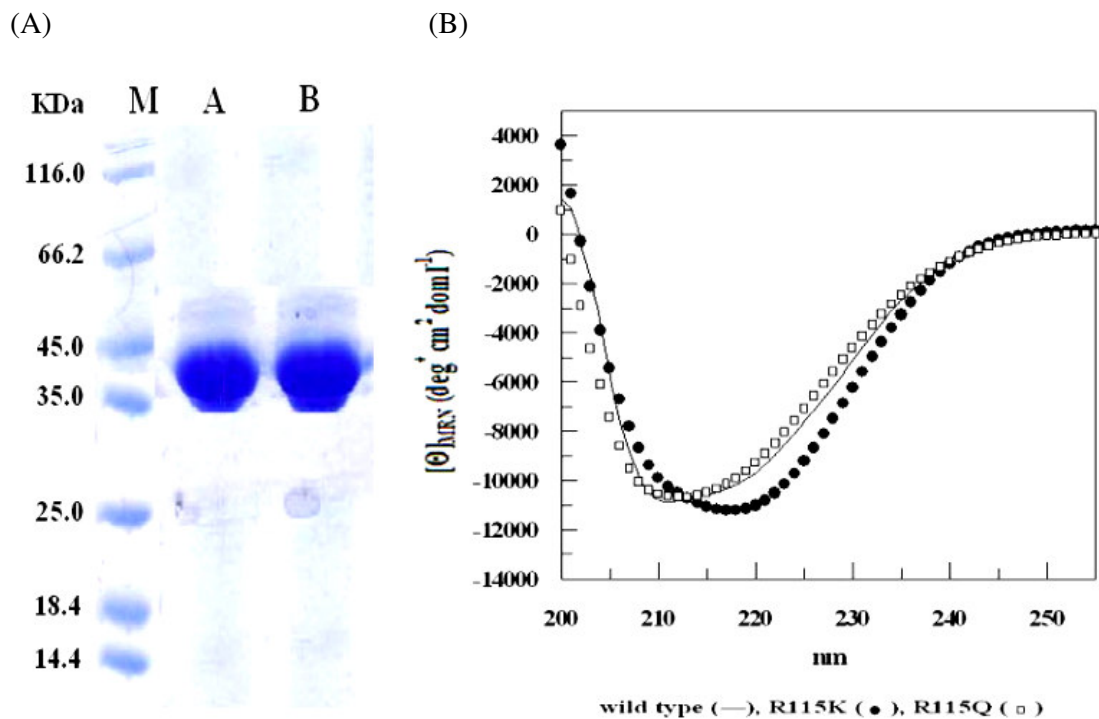


圖 7-2-16、LPHase 突變株 Arg¹¹⁵ 酵素之 SDS-PAGE 和 CD 光譜比較圖。

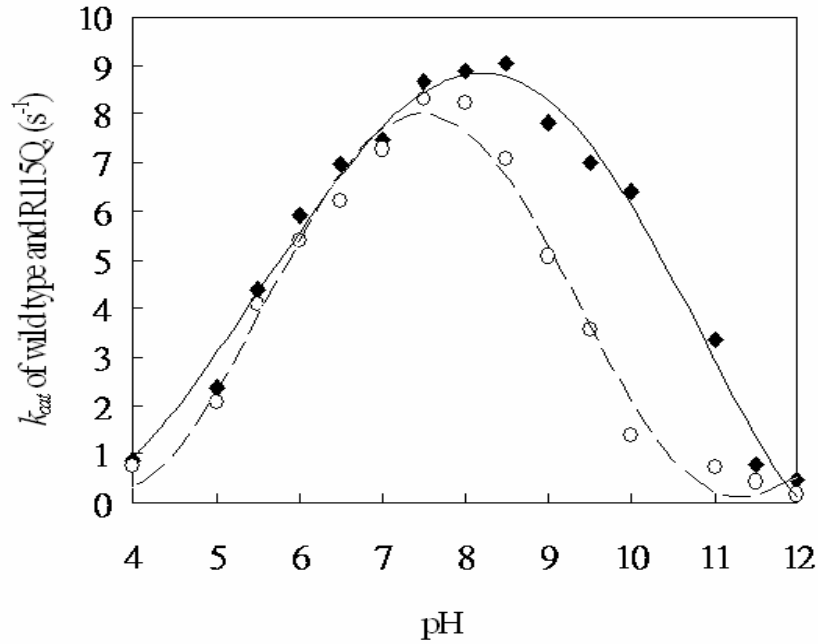
(A) lane M：protein marker (14.4-116 kDa)。

lane A：純化過後之突變株 R115K LPHase。

lane B：純化過後之突變株 R115Q LPHase。

(B) LPHase 野生株與突變株 R115K、R115Q 三酵素之圓二色光譜比較。

(A)



(B)

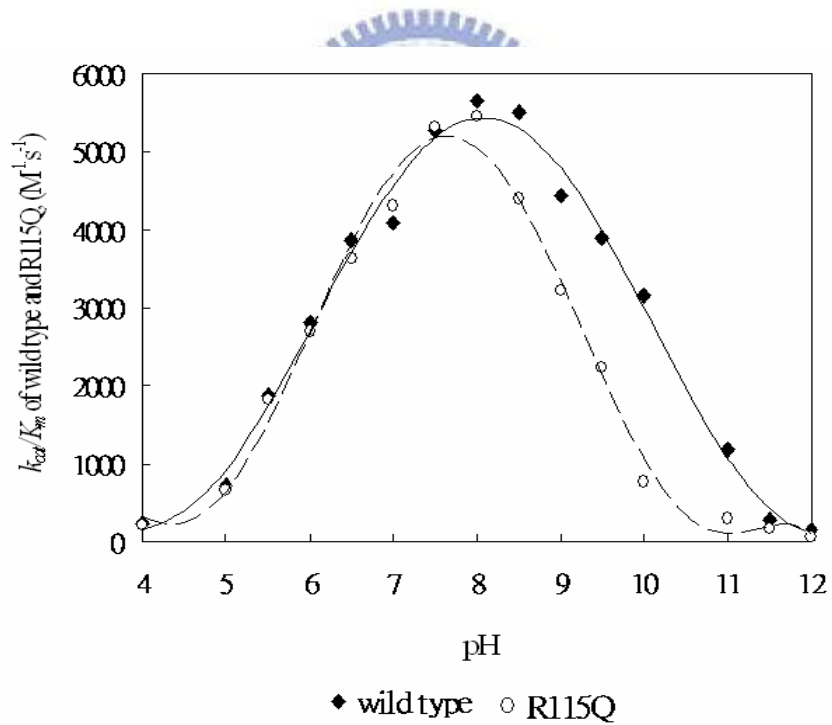


圖 7-1-17、LPHase 之野生株與突變株 R115Q 酵素的 pH-profile。

在 50 mM 的各不同 pH 值(pH 3.0~12.0)緩衝溶液中,野生株 (◆) 與突變株 R115Q (○) LPHase 對受質 *p*-NLPG, 於 37 °C 進行水解反應, 所求得各 pH 值之(A) k_{cat} 值和(B) k_{cat}/K_m 值, 並以 GraFit 5.0 對 k_{cat} 、 k_{cat}/K_m 與 pH 值作圖。

綜合前述 7-1 和 7-2 各章節論點，以古典酵素動力學實驗，利用各定點突變株酵素動力學反應速率值和相對殘餘活性比；再藉由化學活性復活法，以外加疊氮親核性陰離子，可強烈增加扮演一般鹼催化之突變株酵素所失活的活性，並配合 LPHase 蛋白質晶體結構。推測本實驗之 LPHase 酵素是一內/外切型兼具的糖苷水解酵素，包括：催化中心含至少五個糖苷分子以上受質結合次單位區域的外切形式水解反應，而外觀卻為大開口裂縫(open groove)內切型結構之糖苷水解酵素。我們將酵素-糖苷受質在活化中心的鍵結催化模式歸納整理於圖 7-2-18：長鏈聚糖的卡德蘭膠受質鍵結於酵素之裂縫催化中心，各部位糖苷分子與結合次單位區域的胺基酸，形成氫鍵作用力；再由位於 LPHase 蛋白結構凹陷裂縫處之扮演一般鹼催化殘基胺基酸 Asp¹⁷⁰，先進行水分子的極化作用，爾後對糖苷分子一號碳(C1)進行親核性攻擊，使其 β-1,3 糖苷鍵結斷裂，同時，另扮演一般酸催化殘基胺基酸 Glu¹⁵⁴ 擔任質子的提供，使糖苷氧基發生質子化(protonation)亦伴隨著配糖基(aglycone)的離開，整個催化反應過程為似 S_N2 的單取代反轉 催化 機制(single-displacement)，形成以 β-1,3 糖苷 鍵結的 laminaripentaose 寡糖產物。而兩催化殘基團胺基酸之立體空間距離約為 8 ± 0.5 Å。

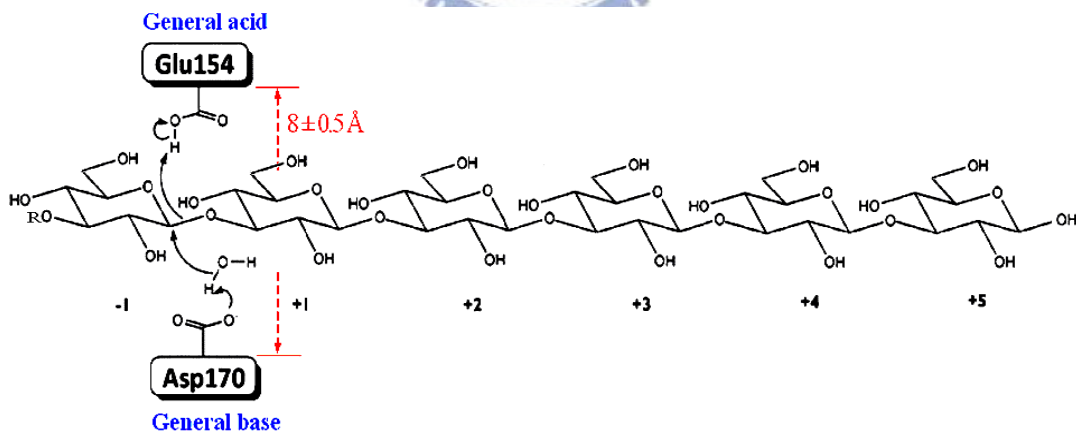


圖 7-2-18、模擬 β-1,3-葡聚糖受質，在酵素催化中心之結合單位及重要反應殘基之位置示意圖。

β-1,3-葡聚糖的 Curdlan 糖苷受質，至少含五個糖苷分子結合單位與酵素活性中心的各胺基酸形成氫鍵鍵結引力，再由 Glu¹⁵⁴ 和 Asp¹⁷⁰ 兩酸性重要催化殘基，以反轉催化機制專一地水解產生 β-1,3-葡聚五糖產物。(圖由 ChemDraw Ultra 8.0 軟體繪製而成)

第八章 結論

1. 本實驗成功以聚合酶連鎖反應(Polymerase Chain Reaction)技術，將 24 段寡核苷酸模板，連接合成 β -1,3-葡聚五糖生產水解酵素人造基因；並建構於 pRSET_A 載體上，過量表現於 BL21(DE3)大腸桿菌系統中。選殖菌株產生之 β -1,3-葡聚五糖生產水解酶為胞內酵素，並於一連串的離子交換樹脂層析管柱純化，得到純度 95 % 以上之 β -1,3-葡聚五糖生產水解酵素，並命名為 LPHase。
2. 將 LPHase 酵素與受質卡德蘭膠進行催化水解反應，酵素最佳的反應條件在 pH 7.5~8.5，而酵素之最佳穩定度在緩衝溶液 pH 5.0 到 pH 9.0 之間。酵素反應催化活性最佳溫度為 55 $^{\circ}$ C，於溫度 25~60 $^{\circ}$ C 之間呈現最佳酵素熱穩定性。在二價金屬離子對 LPHase 酵素之催化活性反應中，並無影響；除了 Hg²⁺離子、DTT 和還原試劑 2-mercaptoethanol 外，對 LPHase 酵素有完全的抑制作用，推測是與酵素內自由的 cys 氨基酸之硫鍵結作用，破壞酵素結構，使得酵素失去原有催化作用。
3. 以 LPHase 酵素生產單一葡聚五糖產物特性，於透析膜中反應，透過透析的效果達到分離未作用膠狀卡德蘭膠和葡聚五糖，製備高達 87 % 產率之高純度葡聚五糖；並以化學合成，含有 UV 吸收之芳香官能基以作酵素動力學之反應受質研究。
4. 反轉機制家族 GH-64 家族之 LPHase，利用 SDSC WORKBENCH 進行胺基酸序列比對，得知 LPHase 蛋白質的 Asp¹⁴³、Glu¹⁵⁴、Asp¹⁷⁰、Asp³⁷⁶ 及 Asp³⁷⁷ 等 5 個酸性胺基酸屬於完全高度保守的殘基。從我們所選擇的九個胺基酸：Asp⁹³、Asp¹⁴³、Glu¹⁵⁴、Asp¹⁵⁹、Asp¹⁷⁰、Asp¹⁸⁴、Asp²²¹、Asp³⁷⁶ 及 Asp³⁷⁷ 進行定點突變，並鑑定分析這些突變株酵素催化水解糖苷受質之動力學和相對反應活性。發現突變株 E154Q 和 D170N 之單位酵素濃度對卡德蘭膠所催化的初始反應活性速率，分別降低約為野生株酵素的 336 和 1014 倍；對合成受質 *p*-NLPG 的活性反應速率值之 K_m 約增大 1~1.5 倍， k_{cat} 減小 900 倍以上，而兩定點突變株酵素之整體催化速率值(k_{cat}/K_m)降為野生株的 1/1700~1/2000。
5. 兩合成抑制劑 EPLPG 和 2DFMNLPG 無法與 LPHase 酵素形成共價鍵結體，因

此，無法以二次質譜之蛋白質定序技術，鑑定扮演一般酸和一般鹼之催化殘基團位置。

6. 由酵素的 pH-dependence 活性實驗反映出一般酸/鹼催化殘基的游離情形(即其 pKa)；和加入疊氮、甲酸…等親核劑陰離子，對突變株 D170G/N 酵素的活性可被復活，但突變株 E154G/Q 酵素則無法復活；並藉由利用 LC/MS 與 $^1\text{H-NMR}$ 進行突變株 D170G 酵素在含有疊氮溶液中，水解反應產物的偵測與分析，可觀測發現葡聚五糖_azid 結合體($m/z = 876.2$)與 α -pentaglucoyl_azide 化學位移的作用產物訊號產生。鑑定 LPHase 酵素於催化活性中心中，Asp¹⁷⁰ 扮演一般鹼性催化殘基，Glu¹⁵⁴ 為一般酸性催化殘基。
7. 不同側鏈長度催化殘基的標示蛋白質 D170C(ss)、D170C(ds) LPHase 酵素，在分別與含有、無 15%乙醇所配製的 2%膠狀卡德蘭膠溶液(20 mM Na₂HPO₄, pH 7.5) 進行水解反應，發現標示酵素並未有任何轉糖作用反應訊號，且在含 15%乙醇下的反應活性皆低於未加乙醇的反應環境。隨催化重要殘基側鏈長度增加，酵素的反應活性漸下降；再者，以 LC/MS 分析標示酵素與膠狀卡德蘭膠作用水解產物，其專一性也降低(修飾的 D170C(ds) 酵素水解產物，為 β -1,3-葡聚二、三、四、五糖不等之寡糖)。於氫核磁共振磁譜長時間追蹤觀察下，兩標示的 D170C(ss)、D170C(ds) LPHase 酵素，催化反應仍舊為單取代反轉機制。顯示酵素的催化機制，無法隨重要殘基側鏈長度之增減，而有所改變。
8. 對僅與扮演一般鹼催化殘基 Asp¹⁷⁰ 相鄰 4.4 Å 的胺基酸 Tyr²³² 而言，和該作用區域周圍的水分子，扮演一重要氫鍵吸引作用力角色。當失去這輔助作用力時，會使得酵素催化反應的速率有所減緩。在相同反應條件下，突變株 Y232A 酵素的相對催化水解活性只有野生株酵素的 38 %。
9. 突變株 R115Q 酵素反應活性之 pH-profile 雖為一鐘形曲線 (bell-shaped curve)，但扮演一般酸性催化之胺基酸所呈現催化反應第二個 pKa 值，其值由約 10~10.5 降低至約 8.5~9。顯示突變株 R115Q 酵素在高 pH 值容易的反應環境中，對參與酵素催化反應的一般酸催化胺基酸基團，於反應作用過程中側鏈基團的游離或一

質子提供，有著重要的影響力。

10. *Streptomyces matensis* DIC-108 菌株中 Laminaripentaose-Producing β -1,3-Glucanase(LPHase)之晶體結構，藉由以硒原子取代 LPHase 酵素上四個 Cys 胺基酸上的硫原子，並利用 X-ray 晶體繞射的方式以多波長非尋常散射，建構出 98.6 % 的 LPHase 晶體結構；高達 1.62 Å 解析度的晶體，為醣苷水解酵素第 64 號家族成員中第一個蛋白質結構。蛋白質晶體為 α/β -混合區域和 β -桶狀區域所結合形成的開口裂縫(open groove)活化中心，為一內切型外觀結構之醣苷水解酵素。從整體酵素結構觀之，催化作用區域的凹口裂縫兩側平均間距更遠大於其他同類之內切裂縫型醣苷水解酵素，約為 20 ~ 25 Å。
11. LPHase 酵素可以催化水解 β -1,3-葡聚多糖之間所鍵結的 β -1,3 醣苷鍵，專一性地分解受質成為 laminaripentaose，為由五個葡萄糖以 β -1,3 醣苷鍵連接之寡醣產物。藉由 LPHase 酵素以 α/β -混合區域和 β -桶狀區域結構，形成至少含五個以上糖苷分子的受質結合次單位區域之裂縫型活化中心；各糖苷分子與受質結合次單位區域附近的胺基酸彼此形成氫鍵作用力，穩定鍵結於 LPHase 酵素催化中心裡，由聚糖鏈還原端以反轉機制的外切型態進行 S_N2 的單取代反轉催化機制水解反應，並以各 LPHase 突變株酵素之動力學數據、受質催化反應之相對活性和化學復活法…等，配合晶體結構的分析鑑定，位於 LPHase 酵素活化中心的催化殘基分別為扮演一般酸催化之 Glu¹⁵⁴ 和一般鹼催化之 Asp¹⁷⁰ 兩酸性胺基酸，決定性地影響 LPHase 酵素的催化活性關鍵。

第九章 參考文獻

1. Simone S., Andrea R., Elmar W., Paul G.Layer, (2006) Fucose in α -(1-6)-linkage regulates proliferation and histogenesis in reaggregated retinal spheroids of the chick embryo. *Glycobiology*, 9, 1171-1179.
2. Becker, D. J., and Lowe, J. B. (2003) Fucose : biosynthesis and biological function in mammals. *Glycobiology*, 13, 41R-53R.
3. Hopper, L.V. and Gordon, J. I. (2001) Glycans as legislator for host-microbial interaction: spanning the spectrum from symbiosis to pathogenicity. *Glycobiology*, 11, 1-10.
4. M. G. Giardina, M. Matarazzo, A. Varriale, R. Morante, A. Napoli, R. Martino. (2006) Serum α -L-fucosidase. A useful marker in the diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Cancer*, 70, 1044 – 1048.
5. Listinsky, J.J., Siegal, G. P., and Listinsky, C. M. (1998) α -L-fucose: a potentially critical molecule in pathologic processes including neoplasia. *Am. J. Clin. Pathol.*, 110, 425-440.
6. Staudacher, E., Altmann, F., Wilson, I.B., and Marz, L. (1999) Fucose in N-glycans: from plant to man. *Biochim. Biophys. Acta*, 1493, 216-236.
7. Becker, D. J. and Lowe, J. B. (1999) Leukocyte adhesion defucency type II. *Biochim. Biophys. Acta*, 1455, 193-204.
8. Vanhooren, P. T., and Vandamme, E. J. (1999) L-Fucose: Occurrence, physiological role, chemical, enzymatic and microbial synthesis. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 74, 479-497.
9. Augur, C., Benhamou, N., Darvill, A., and Albersheim, P. (1993) Purification, characterization, and cell wall localization of an α -L-fucosidase that inactivates a xyloglucan oligosaccharin. *Plant J.*, 3, 415-426.

10. Augur, C., Stiefel, V., Darvill, A., Albersheim, P., and Puigdome` nech, P. (1995) Molecular cloning and pattern of expression of an α -L-fucosidase gene from pea seedlings. *J. Biol. Chem.*, 270, 24839-24843.
11. Giardina, M. G, Matarazzo, M., Morante, R., Lucariello, A., Varriale, A., Guardasole, V., and De Marco, G. (1998) Serum α -L-fucosidase activity and early detection of *hepatocellular carcinoma*. *Cancer*, 83, 2468-2474.
12. Barker, C., Dell, A., Rogers, M., Alhadeff, J. A., and Winchester, B. (1988) Canine α -L-fucosidase in relation to the enzymic defect and storage products in canine fucosidosis. *Biochem. J.*, 254, 861-868.
13. Warner, T. G., and O'Brien, J. S. (1983) Genetic defects in glycoprotein metabolism. *Ann. Rev. Genet.*, 17, 395-441.
14. Abraham, D., Blakemore, W. F., Dell, A., Herrtage, M. E., Jones, J., Littlewood, J. T., Oates, J., Palmer, A. C., Sidebotham, R., and Winchester, B. (1984) The enzyme defect and storage products in canine fucosidosis. *Biochem. J.*, 221, 25-33.
15. Watkins, P., and Alhadeff, J. A. (1981) Kinetic and immunochemical characterization of α -L-fucosidase from vertebrate livers. *Comp. Biochem. Physiol.*, 68B, 509-516.
16. Lissens, W., Vrijssen, R., Sijen, R. J., Liebaers, I., and Boeye A. (1985) Demonstration of human α -L-fucosidase polymorphism by means of monoclonal antibodies. *Biochim. Biophys. Acta.*, 831, 281-287.
17. Alhadeff, J. A., and Janowsky, A. J. (1975) Human serum α -L-fucosidase. *Clinic Chim Acta.*, 82, 133-140.
18. Laury-Kleintop, L. D., Alhadeff, J. A., and Damjanov, I. (1985) Isoelectric forms of α -L-fucosidase in mouse teratocarcinoma derived cell lines. *Devl. Biol.*, 111, 520-524.
19. Alhadeff, J. A., and Andrews-Smith, G. L. (1984) Radioimmunochemical evidence for role of carbohydrate in antigenic determinants on human liver α -L-fucosidase. *Biochem. J.*, 223, 293-298.

20. Beem, E. P., W Lisman, J. J., Van Steijn, G. J., Van Der Wal, C. J., W Trippelwitz, L.A., Overdijk, B., Van Halbeek, H., Mutsaers, J. H. G. M. and Vliegthart, J. F. G. (1987) Structure analysis of the carbohydrate moieties of α -L-fucosidase from human liver. *Glycoconjugate J.*, 4, 33-42.
21. Argade, S. P., Hopfer, R. L., Strang, A. M., Van Halbeek, H. and Alhadeff, J. A. (1988) Structure studies on the carbohydrate moieties of human liver α -L-fucosidase. *Archs Biochem. Biophys.*, 226, 227-247.
22. Fukushima, H., DeWet, J. R. and O'Brien, J. S. (1985) Molecular cloning of a cDNA for human α -L-fucosidase. *Proc. Natn. Acad. Sci. USA*, 82, 1262-1265.
23. Fisher, K. J. and Aronson, N. N. Jr. (1989) Isolation and sequence analysis of a cDNA encoding rat liver α -L-fucosidase. *Biochem. J.*, 264, 695-701.
24. Piesecki, S., and Alhadeff, J. A. (1992) The effect of carbohydrate removal on the properties of human liver α -L-fucosidase. *Biochim Biophys Acta.*, 1119, 194.
25. Chien, S. and Dawson, G. (1980) Purification and properties two forms of α -L-fucosidase. *Biochim. Biophys. Acta*, 614, 476-488.
26. DiCioccio, R. A., Barlow, J. J. and Matta, K. L. (1983) Heat stability and pH activity data α -L-fucosidase in human serum vary with enzyme concentration. *Enzyme*, 30, 122-128.
27. Thorpe, R. and Oates, M. D. G. (1978) The hydrolysis of L-fucose from some naturally occurring compounds by purified human liver α -L-fucosidase. *Carbohydr. Res.*, 60, 407-411.
28. Johnson, S. W., and Alhadeff, J. A. (1991) Mammalian α -L-fucosidase. *Comp. Biochem. Physiol.*, 99B, 479-488.
29. Turner B. M., Beratis N. G., and Hirschhorn K. (1975) Silent allele as genetic basis of fucosidosis. *Nature*, 257, 391-392.
30. Michalski, J. C., Wieruszkeski, J. M., Alonso, C., Cache, P., Montreuil, J., and Strecker,

- G. (1991) Characterization and 400 MHz ¹H NMR analysis of urinary fucosyl glycoasparagines in fucosidosis. *Eur. J. Biochem.*, 201, 439-458.
31. Tiberio, G., Filocamo, M., Gatti, R., and Durand, T. (1995) Mutations in the fucosidosis gene: a review. *Acta Genet. Med. Gemellol.*, 44, 223-232.
32. Cragg, H., Williamson, M., Young, E., O'Brien, J., Alhadeff, J., Fang-Kircher, S., Paschke, E., and Winchester, B. (1997) Fucosidosis: genetic and biochemical analysis of eight cases. *J. Med. Genet.*, 34, 105-110.
33. Noronkoski, T., and Mononen, I. (1997) Influence of L-fucose attached α 1-6 to asparagine-linked N-acetylglucosamine on the hydrolysis of the N-glycosidic linkage by human glycosylasparaginase. *Glycobiology*, 7, 217-220.
34. Haeuw, J. F., Grard, T., Alonso, C., Strecker, G., and Michalski, J. C. (1994) The core specific lysosomal α -(1-6)-mannosidase activity depends on aspartamido hydrolase activity. *Biochem. J.*, 297, 463-466.
35. Scanlin, T. F., Matacic, S. S., Pace, M., Santer, U. V. and Glick, M. C. (1977) Abnormal distribution of α -L-fucosidase in cystic fibrosis : increased activity in skin fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 79, 869-875.
36. Scanlin, A. T. F., Smit-Matacic, S. and Glick, M. C. (1979) Abnormal distribution of α -L-fucosidase in cystic fibrosis : decreased activity in serum. *Clin. Chim. Acta.*, 91, 197-202.
37. Deugnier, Y., David, V., Brissot, P., Mabo, P., Delamaire, D., Messner, M., Legall, J. (1984) Serum α -L-fucosidase: A new marker for the diagnosis of primary hepatic carcinoma. *Hepatology*, 4, 889-892.
38. Takahashi, H., Saibara, T., Iwamura, S., Tomita, A., Maeda, T., Onishi, S., Yamamoto, Y. and Enzan, H. (1994) Serum α -L-fucosidase activity and tumor size in hepatocellular carcinoma. *Hepatology.*, 19, 1414-1417.
39. Giardina, M.G., Matarazzo, M., Varriale, A., Morante, R., Napoli, A., and Martino, R.

- (1992) Serum α -L-fucosidase. A useful marker in the diagnosis of *hepatocellular carcinoma*. *Cancer*, 70, 1044-1048.
40. Ayude, D., Fernandez-Rodriguez, J., Rodriguez-Berrocal, F. J., Martinez-Zorzano, V. S., de Carlos, A., Gil, E., Paez de La Cadena, M. (2000) Value of the serum α -L-fucosidase activity in the diagnosis of colorectal cancer. *Oncology*, 59, 310-316.
41. Ayude, D., Fernandez-Rodriguez, J., Rodriguez-Berrocal, F. J., Martinez-Zorzano, V. S., de Carlos, A., Gil, E., Paez de La Cadena, M. (2003) Preoperative serum α -L-fucosidase activity as a prognostic marker in colorectal cancer. *Oncology*, 64, 336-45.
42. Han Y. W. and Srinivasan V. R. (1969) *J. Bacteriol.*, 100, 1355-1363.
43. Aminoff, D., and Furukawa, K. (1970) Enzymes that destroy blood group specificity. *J. Biol. Chem.*, 7, 1659-1669.
44. Kochibe, N. (1973) Purification and properties of α -L-fucosidase from *Bacillus fulminans*. *J. Biochem.*, 74, 1141-1149.
45. Sano, M., Hayakawa, K., and Kato, I. (1992) Purification and characterization of α -L-fucosidase from *Streptomyces species*. *J. Biol. Chem.*, 267, 1522-1527.
46. Wong-Madden, S. T., and Landry, D. (1995) Purification and characterization of novel glycosidases from the bacterial genus *Xanthomonas*. *Glycobiology*, 5, 19-28.
47. Yamamoto, K., Tsuji, Y., Kumagai, H., and Tochikura, T. (1986) Induction and purification of α -L-fucosidase from *Fusarium oxysporum*. *Agric. Biol. Chem.*, 50, 1689-1695.
48. Yazawa, S., Madiyalakan, R., Chawda, R. P., and Matta, K. L. (1986) α -L-Fucosidase from *Aspergillus niger*. Demonstration of a novel α -L-(1-6)-fucosidase acting on glycopeptides. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 136, 563-569.
49. Kobata, A. (1982) α -L-Fucosidases from almond emulsion. *Methods Enzymol.*, 83, 625-631.

50. Henrissat, B. (1991) A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.*, 280, 309-316
51. Wolfenden, R., Lu, X., and Young, G. (1998) Spontaneous hydrolysis of glycosides. *J. Am. Chem. Soc.*, 120, 6814-6815.
52. Chothia C. (1992) Proteins. One thousand families for the molecular biologist. *Nature*, 357, 543-544.
53. Dan, S. and Marton, I. (1999) Cloning, Expression, Characterization, and Nucleophile Identification of Family 3, *Aspergillus niger* β -glucosidase. *J. Biol. Chem.*, 275, 4973-4980.
54. Henrissat, B., and Bairoch, A. (1996) Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. *Biochem. J.*, 316, 695-696.
55. Varghese, J. N., Hrmova, M., and Fincher, G. B. (1999) Three-dimensional structure of a barley family 3 glycosyl hydrolase. *Structure with Folding & Design.*, 7, 179-190.
56. Tarling, C. A., He, S., Sulzenbacher, G., Bignon, C., Bourne, Y., Henrissat, B., and Withers, S. G. (2003) Identification of the catalytic nucleophile of the family 29 α -L-fucosidase from *Thermotoga maritima* through trapping of a covalent glycosyl-enzyme intermediate and mutagenesis. *J. Biol. Chem.*, 278, 47394-9.
57. Katayama, T., Sakuma, A., Kimura, T., Makimura, Y., Hiratake, J., Sakata, K., Yamanoi, T., Kumagai, H., and Yamamoto, K. (2004) Molecular cloning and characterization of *Bifidobacterium bifidum* 1,2- α -L-fucosidase (AfcA), a novel inverting glycosidase (glycoside hydrolase family 95). *J. Bacteriol.*, 186, 4885-93.
58. McCarter, J., and Withers, S. G. (1994) Mechanisms of enzymatic glycoside hydrolysis. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 4, 885-892.
59. Davies, G., Sinnott, M. L., and Withers, S. G. (1998) In Comprehensive Biological Catalysis (Sinnott, M. L., ed). *Academic Press, London.*, 1, 119-208.
60. Howard, S., and Withers, S. G. (1998) Labeling and identification of the postulated

- acid/base catalyst in the α -glucosidase from *Saccharomyces cerevisiae* using a novel bromoketone C-glycoside. *Biochemistry*, 37, 3858-3864.
61. Moracci, M., Trincone, A., Perugino, G., Ciaramella, M., and Rossi, M. (1998) Restoration of the activity of active-site mutants of the hyperthermophilic β -glycosidase from *Sulfolobus solfataricus*: Dependence of the mechanism on the action of external nucleophiles. *Biochemistry*, 37, 17262-17270
62. MacLeod, A.M., Tull, D., Rupitz, K, Warren, R.A.J., and Withers, S.G. (1996) Mechanistic consequences of mutation of active site carboxylates in a retaining β -1,4-glycanase from *Cellulomonas fimi*. *Biochemistry*, 35, 13165-13172
63. Sulzenbacher, G., Bignon, C., Nishimura, T., Tarling, C. A., Withers, S. G., Henrissat, B., and Bourne, Y. (2004) Crystal structure of *Thermotoga maritima* alpha-L-fucosidase. Insights into the catalytic mechanism and the molecular basis for fucosidosis. *J Biol Chem.*, 279, 13119-28.
64. Masamichi Nagae, Atsuko Tsuchiya, Takane Katayama, Kenji Yamamoto, Soichi Wakatsuki, and Ryuichi Kato. (2007) Structural Basis of the Catalytic Reaction Mechanism of Novel 1,2- α -L-Fucosidase from *Bifidobacterium bifidum*. *J. Biol. Chem.*, 282, 18497-509.
65. Cobucci-Ponzano, B., Trincone, A., Giordano, A., Rossi, M., and Moracci, M. (2003) Identification of the catalytic nucleophile of the family 29 alpha-L-fucosidase from *Sulfolobus solfataricus* via chemical rescue of an inactive mutant. *Biochemistry*, 42, 9525-31.
66. Cobucci-Ponzano, B., Mazzone, M., Rossi, M., and Moracci, M. (2005) Probing the catalytically essential residues of the alpha-L-fucosidase from the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Biochemistry*, 44, 6331-42.
67. Miura, T., Okamoto, K., and Yanase, H. (2005) Purification and characterization of extracellular 1,2- α -L-fucosidase from *Bacillus cereus*. *J Biosci Bioeng.*, 99, 629-35.

68. Moracci, M., Trincone, A., Perugino, G., Ciaramella, M., and Rossi, M. (1998) Restoration of the activity of active-site mutants of the hyperthermophilic beta-glycosidase from *Sulfolobus solfataricus*: Dependence of the mechanism on the action of external nucleophiles. *Biochemistry*, 37, 17262-17270.
69. MacLeod, A.M., Tull, D., Rupitz, K., Warren, R.A.J., and Withers, S.G. (1996) Mechanistic consequences of mutation of active site carboxylates in a retaining beta-1,4-glycanase from *Cellulomonas fimi*. *Biochemistry*, 35, 13165-13172.
70. Wang, Q., Trimbur D., Graham, R., Warren, R. A. J., and Withers, S.G. (1995) Identification of the acid/base catalyst in *agrobacterium-faecalis* beta-glucosidase by kinetic-analysis of mutants. *Biochemistry*, 34, 14554-14562.
71. Gebler, J.C., Trimbur, D.E., Warren, A.J., Aebersold, R., Namchuk, M., and Withers, S.G. (1995) Substrate-induced inactivation of a crippled beta-glucosidase mutant - identification of the labeled amino-acid and mutagenic analysis of its role. *Biochemistry*, 34, 14547-14553.
72. Viladot, J.L., de Ramon, E., Durany, O., and Planas, A. (1998) Probing the mechanism of Bacillus 1,3-1,4-beta-D-glucan 4-glucanohydrolases by chemical rescue of inactive mutants at catalytically essential residues. *Biochemistry*, 37, 11332-11342.
73. Zechel, D.L., and Withers, S.G. (2000) Glycosidase mechanisms: Anatomy of a finely tuned catalyst. *Acc. Chem. Res.*, 33, 11-18.
74. Donald, E. T., Warren, R. A. J., and Withers, S. G. (1992) Region-directed Mutagenesis of Residues Surrounding the Active Site Nucleophile in β -Glucosidase from *Agrobacterium faecalis*. *J. Biol. Chem.*, 267, 10248-10251.
75. Withers, S. G., Rupitz, K., Trimbur, D., and Warren, R. A. J. (1992) Mechanistic Consequences of Mutation of the Active Site Nucleophile Glu 358 in *Agrobacterium* β -Glucosidase. *Biochemistry*, 31, 9979-9985.

76. Withers, S. G., Warren, R. A.J., Street, I. P., Rupitz, K., Kempton, J. B., and Aebersold, R. (1990) Unequivocal Demonstration of the Involvement of a Glutamate Residue as a Nucleophile in the Mechanism of a “Retaining” Glycosidase. *J. Am. Chem.Soc.*, 112, 5887-5889.
77. Withers, S. G. and Aebersold, R., (1995) Approaches to labeling and identification of active site residues in glycosidases. *Protein Science*, 4, 361-372.
78. Juffer, A. H. (1998) Theoretical calculations of acid-dissociation constants of proteins. *Biochem. Cell Biol.*, 76, 198–209.
79. Ly, H. D., and Withers, S. G. (1999) Mutagenesis of glycosidases. *Annu. Rev. Biochem.*, 68, 487-522.
80. Wang, Q, Withers, S. G. (1995) Substrate-assisted catalysis in glycosidases. *J. Am. Chem.Soc.* 117, 10137-10378.
81. White, J. W., Schray, K. J, Legler, G. and Alhadeff, J. A. (1986) Active-site-directed inactivation of human liver α -L-Fucosidase by conduritol C trans-epoxide. *Biochim. Biophys. Acta*, 873, 198-203.
82. Eneyskaya, E. V., Kulminskaya, A. A., Kalkkinen, N., Nifantiev, N. E., Arbatskii, N. P., Saenko, A. I., Chepurnaya, O. V., Arutyunyan, A. V., Shabalin, K. A., and Neustroev, K. N. (2001) An α -L-fucosidase from *Thermus sp.* with unusually broad specificity. *Glycoconj. J.*, 18, 827–834.
83. Berteau, O., McCort, I., Goasdoue, N., Tissot, B., and Daniel, R. (2002) Sulfated fucans, fresh perspectives: structures, functions, and biological properties of sulfated fucans and an overview of enzymes active toward this class of polysaccharide. *Glycobiology*, 12, 273–282.
84. Grove D. S. and Serif G. S. (1981) Procine thyroid fucosidase. *Biochim. Biophys. Acta*, 662, 246-255.
85. White, J. W., Schray, K. J, Legler, G. and Alhadeff, J. A. (1985) Studies on the

- catalytic residues at the active site of human liver α -L-Fucosidase. *Biochim. Biophys. Acta*, 829, 303-310.
86. White, W. J., Jr., Schray, K. J., Legler, G., and Alhadeff, J. A. (1987) Further studies on the catalytic mechanism of human liver alpha-L-fucosidase. *Biochim. Biophys. Acta*, 912, 132–138.
87. Henrissat, B. (1991) A classification of glycosyl hydrolase based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.*, 280, 309-316.
88. McCarter, J.D., and Withers, S. G. (1994) Mechanism of enzymatic glycoside hydrolysis. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 4, 885-892.
89. Guofeng, Gu., Yuguo, Du., Hongyan, Hu., and Cheng, Jin. (2003) Synthesis of 2-chloro-4-nitrophenyl α -L-fucopyranoside: a substrate for α -L-fucosidase (AFU). *Carbohydr. Res.*, 338, 1603-1607.
90. Wegmann, B., and Schmidt, R. R. (1985) Synthesis of the H-disaccharide (2-O- α -L-fucopyranosyl-D-galactose) via the trichloroacetimidate method. *Carbohydr. Res.*, 184, 254-261.
91. Alejandro de Carlos, Dolores Montenegro, Ana Alonso-Rodriguez, Maria Paez dela Cadena, and Vicenta Soledad Martinez-Zorzano. (2003) Purification of human alpha-L-fucosidase precursor expressed in *Escherichia coli* as a glutathione S-transferase fusion protein. *J. Chromatog. B*, 786, 7–15.
92. 陳朝勝 (2006) 交通大學應用化學所碩士論文.
93. Legler, G., Stitz, A. E., and Immich, H. (1995) Synthesis of 1,5-dideoxy-1,5-imino-D-arabinitol (5-nor-1-fuco-1-deoxynojirimycin) and its application for the affinity purification and characterisation of α -L-fucosidase. *Carbohydr. Res.*, 272, 17-30.
94. Durkee, A. B., and Siddiqui, I. R. (1979) Syntheses of 4-O- β -D-glucopyranosyl derivatives of phenolic acids of natural occurrence in plants. *Carbohydr. Res.*, 77,

252-254 .

95. Black T. S., Laszlo K., Tull D., and Withers, S. G. (1993) N-Bromoacetyl-glycopyranosylamines as affinity labels for a β -glucosidase and a cellulase. *Carbohydr. Res.*, 250, 195-202
96. 陳韋宏 (2005) 交通大學應用化學所碩士論文.
97. Alhadeff, J. A., Miller, A. L., Wenaas, H., Vedvick, T., and O'Brien, J. S. (1975) Human liver α -L-fucosidase Purification, characterization, and immunochemical studies. *J. Biol. Chem.*, 250, 7106-7113.
98. Wu, C.-Y., Chang, C.-F., Chen, J. S.-Y., Wong, C.-H., and Lin, C.-H. (2003) Rapid diversity-oriented synthesis followed by In situ screening: identification as potent and selective α -L-fucosidase inhibitors. *Angew. Chem., Int. Ed.*, 42, 4661-4664.
99. Chang, C.-F., Ho, C.-W., Wu, C.-Y., Chao, T.-A., Wong, C.-H. and Lin, C.-H. (2004) Discovery of picomolar slow tight-binding inhibitors of α -L-fucosidase. *Chem. Biol.*, 11, 1301-1306.
100. Ho, C. W., Lin, Y. N., Chang, C. F., Li, S.T., Wu, Y. T., Wu, C. Y., Chang, C. F., Liu, S. W., Li, Y. K., and Lin, C. H. (2006) Discovery of different types of inhibition between the human and *thermotoga maritima* alpha-fucosidases by fuconojirimycin-based derivatives. *Biochemistry*, 45, 5695-702.
101. Cobucci-Ponzano, B., Conte, F., Rossi, M., and Moracci, M. (2008) The alpha-L-fucosidase from *Sulfolobus solfataricus*. *Extremophiles*, 12, 61-8.
102. Varghese, J. N., Hrmova, M., and Fincher, G. B. (1999) Three-dimensional structure of a barley family 3 glycosyl hydrolase. *Structure with Folding & Design*. 7, 179-190.
103. Thomas, .E. W. (1970) Potential specific inhibitors of the lactose transport system of *Escherichia coli*. *J. Med. Chem.*, 13, 755-756.
104. Dale., M. P., Ensley, H. E., Kern K., Sastry, K. A. P., and Byers, L. D. (1985) Reversible inhibitors of beta -glucosidase. *Biochemistry*, 24, 3530-3539

105. Antimo D'anello, John hakimi, Giuseppe M. cacace and Constante ceccarini. (1982) The Purification and Characterization of α -L-Fucosidase from the Hepatopancreas of *Octopus vulgaris*. *J. Biochem.*, 91, 1073-1080.
106. Richard, A., DiCioccio, Joseph, J., Barlow, and Matta, K. L. (1982) Substrate Specificity and Other Properties of α -L-Fucosidase from Human Serum. *J. Biol. Chem.*, 257, 714-718.
107. Winchester, B., Barker, C., Baines, S., Jacob, G. S., Namgoong, S. K., and Fleet, G. (1990) Inhibition of α -L-fucosidase by derivatives of deoxyfuconojirimycin and deoxymannojirimycin. *Biochem J.*, 265, 277-282.
108. Olivier Berteau, Isabelle McCort, Nicole Goasdoué, Bérangère Tissot and Régis Daniel. (2002) Characterization of a new α -L-fucosidase isolated from the marine mollusk *Pecten maximus* that catalyzes the hydrolysis of α -L-fucose from algal fucoidan (*Ascophyllum nodosum*). *Glycobiology*, 12, 273-282.
109. Lansing, C., Hoskins, Erwin, T., Boulding and Larson, G. (1997) Purification and Characterization of Blood Group A-degrading Isoforms of α -N-Acetylgalactosaminidase from *Ruminococcus torques* Strain IX-70. *J. Biol. Chem.*, 272, 7932-7939.
110. Fleet, G. W. J., Shaw, A. N., Evans, S. V., and Fellows, L. E. (1985) *J. Chem. Soc. Chem. Commu.*, 841-842.
111. Paulsen, H., and Matzke, M. (1988) *Liebigs Ann.Chem.*, 1121-1126.
112. Febbraio, F., Barone, R., D'Auria, S., Rossi, M., Nucci, R., Piccialli, G., De Napoli, L., Orru, S. and Pucci, P. (1997) Identification of the active site nucleophile in the thermostable β -glycosidase from the archaeon *Sulfolobus solfataricus* expressed in *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 36, 3068-3075.
113. Hrmova, M., MacGregor, E., Biely, P., Stewart, J., and Fincher, G. B. (1998) Substrate binding and catalytic mechanism of a barley β -D-glucosidase/(1,4)- β -D-glucan

- exohydrolase. *J. Biol. Chem.*, 273, 11134-11143.
114. Moracci, M., Trincone, A., Perugino, G., Ciaramella, M., and Rossi, M. (1998) Restoration of the activity of active-site mutants of the hyperthermophilic beta-glycosidase from *Sulfolobus solfataricus*: Dependence of the mechanism on the action of external nucleophiles. *Biochemistry*, 37, 17262-17270.
115. Li, Y.-K., Chir, J., Tanaka, S., and Chen, F. Y. (2002) Identification of the general acid/base catalyst of a family 3 β -glucosidase from *flavobacterium meningosepticum*. *Biochemistry*, 41, 2751-2759.
116. Mehta, V. B., and Vaidya, B. S. (1990) Cellular and Extracellular Polysaccharides of the Blue green Alga Nostoc. *J. Exp. Bot.*, 29, 1423-1430.
117. Heald, P. J., and Kristiansen, B. (2004) Synthesis of polysaccharide by yeast-like forms of *Aureobasidium pullulans*. *Biotechnology and Bioengineering*, 27, 1516 – 1519.
118. Reis, R. A., Tischer, C. A., Gorin, P. A. J., and Iacomini, M. (2002) A new pullulan and a branched (1 \rightarrow 3),(1 \rightarrow 6)-linked β -glucan from the lichenised ascomycete *Teloschistes flavicans*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 210, 1-5.
119. Federico Katzen, Diego U. Ferreiro, Cristian G. Oddo, M. Verónica Ielmini, Anke Becker, Alfred Pühler, and Luis Ielpil. (1998) *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* gum Mutants: Effects on Xanthan Biosynthesis and Plant Virulence. *J. Bacteriol.*, 180, 1607–1617.
120. Pretus, H. A., Ensley, H. E., McNamee, R. B., Jones, E. L., Browder, I. W., and Williams, D. L. (1991) Isolation physicochemical characterization and preclinical efficacy evaluation of soluble scleroglucan. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 257, 500-510.
121. Johnson, I. T., Livesey, G., Gee, J. M., Brown, J. C., and Wortley, G. M. (1990) The biological effects and digestible energy value of a sugar-beet fibre preparation in the rat. *Brit. J. Nutr.*, 64, 187-199.

122. Stark, A. H., and Madar, Z. (1993) In Vitro Production of Short-Chain Fatty Acids by Bacterial Fermentation of Dietary Fiber Compared with Effects of Those Fibers on Hepatic Sterol Synthesis in Rats. *J. Nutr.*, 123, 2166-2173.
123. Baik, K. J., Kim, K.C., Cheon, Y. C., and Kim, W. S. (1997) Recrystallization kinetics and glass transition of rice starch gel system. *J. Agr. Food Chem.*, 45, 4242-4248.
124. Goy, C., and Jezequel, S. (1998) Single photon and multiphoton production in e^+e^- collisions at a center-of-mass energy of 183-GeV. *Phys. Lett. B*, 429, 201-214.
125. Boots, J. W. P., van Dongen, W. D., Verheij, H. M., de Haas, G. H., Haverkamp, J., and Slotboom, A. J. (1995) Identification of the active site histidine in *Staphylococcus hyicus* lipase using chemical modification and mass spectrometry. *Biochim. Biophys. Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1248, 27-34.
126. Fiske, S. T., Xu, J., and Cuddy, A. C. (1990) (Dis)respecting versus (dis)liking: Status and interdependence predict ambivalent stereotypes of competence and warmth. *J. Social Issues*, 55, 473-489.
127. Kraus, J., and Franz, G. (1997) β -1,3-Glucans: anti-tumor activity and immunostimulation. *Adv. Study Inst. Ser. H Cell Biol.*, 53, 431-444.
128. Bohn, J. A., and BeMiller, J. N. (1995) (1 \rightarrow 3)- β -D-Glucans as biological response modifiers: a review of structure-functional activity relationships. *Carbohydr. Polym.*, 28, 3-14.
129. Martin, K., McDougall, B. M., McIlroy, S., Chen, J., and Seviour, R. J. (2007) Biochemistry and molecular biology of exocellular fungal β -(1,3)- and β -(1,6)-glucanases. *FEMS Microbiol. Rev.*, 31, 168-192.
130. Misaki, A., and Kakuta, M. (1997) Fungal 1,3- β -D-glucans: chemistry and antitumor activity. *Carbohydr. Drug Design*, 4, 655-689.
131. Sherwood, E. R., Williams, D. L., McNamee, R. B., Jones, E. L., Browder, I. W., and Di Luzio, N. R. (1987) Enhancement of interleukin-1 and interleukin-2 production by

- soluble glucan. *Int. J. Immunopharmacol.*, 9, 261-267.
132. Wang, S. Y., Hsu, M. L., Hsu, H. C., Tzeng, C. H., Lee, S. S., Shiao, M. S., and Ho, C. K. (1997) The anti-tumor effect of *Ganoderma lucidum* is mediated by cytokines released from activated macrophages and T lymphocytes. *Int J Cancer.*, 70, 699-705.
133. Liu, G. Q., Zhang, K. C. (2005) Mechanisms of the Anticancer Action of *Ganoderma lucidum* (Leyss. ex Fr.) Karst.: A New Understanding. *J. Integr. Plant. Boil.*, 47, 129-135.
134. Zekovic, D. B., Kwiatkowski, S., Vrvic, M. M., Jakovljevic, D., and Moran, C. A. (2005) Natural and modified (1→3)-β-D-glucans in health promotion and disease alleviation. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 25, 205-230.
135. Wasser, S. P. (2002) Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 60, 258-274.
136. Ross, G. D., Vetvicka, V., Yan, J., Xia, Y., and Vetvickova, J. (1999) Therapeutic intervention with complement and β-glucan in cancer. *Immunopharmacology*, 42, 61-74.
137. Ross, G. D., Cain, J. A., Myones, B. L., Newman, S. L., and Lachmann, P. J. (1987) Specificity of membrane complement receptor type three (CR3) for β-glucans. *Complement*, 4, 61-74.
138. Cain, J. A., Newman, S. L., and Ross, G. D. (1987) Role of complement receptor type three and serum opsonins in the neutrophil response to yeast. *Complement*, 4, 75-86.
139. Vetvicka, V., Thornton, B. P., and Ross, G. D. (1996) Soluble β-glucan polysaccharide binding to the lectin site of neutrophil or natural killer cell complement receptor type 3 (CD11b/CD18) generates a primed state of the receptor capable of mediating cytotoxicity of iC3b-opsonized target cells. *J Clin. Invest.*, 98, 50-61.
140. Shao, B. M., Dai, H., Xu, W., Lin, Z. B., and Gao, X. M. (2004) Immune receptors for polysaccharides from *Ganoderma lucidum*. *Biochem Biophys Res Commun.*, 323,

- 133-141.
141. Adams, D. J. (2004) Fungal cell wall chitinases and glucanases. *Microbiol.*, 150, 2029-2035.
142. Di Luzio, N. R., Williams, D. L., McNamee, R. B., Edwards, B. F., and Kitahama, A. (1979) Comparative tumor-inhibitory and anti-bacterial activity of soluble and particulate glucan. *Int. J. Cancer.*, 24, 773-779.
143. Cook, J. A., Taylor, D., Cohen, C., Rodrique, J., Malshet, V., and Di Luzio, N.R. (1978) Comparative evaluation of the role of macrophages and lymphocytes in mediating the antitumor action of glucan. In: *Immune Modulation and Control of Neoplasma by Adjuvant Therapy, Progress in Cancer Research and Therapy*. Edited by Chirigos MA. New York: Raven Press, 7, 183-193.
144. Kitamura, S., Hori, T., Kurita, K., Takeo, K., Hara, C., Itoh, W., Tabata, K., Elasaeter, A., and Stokke, B. T. (1994) An antitumor branched β -(1 \rightarrow 3)-glucan from a water extract of fruiting bodies of *Cryptoporus colvatus*. *Carbohydr. Res.*, 263, 111-116.
145. Bohn, J. A., and BeMiller, J. N. (1995) β -(1 \rightarrow 3)-glucans as biological response modifiers: a review of structure-functional activity relationships. *Carbohydr. poly.*, 28, 3-7.
146. Matsuoka, H., Seo, Y., Wakasugi, H., Saito T., and Tooda, H. (1997) Lentinan potentiates immunity and prolongs the survival time of some patients. *Anticancer Res.*, 17, 2751-2756.
147. Nakano, T., Oka, K., Hanba, K., and Morita, S. (1996) Intratumoral administration of sizofiran activates Langerhans cell and T-cell infiltration in cervical cancer. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 79, 79-84.
148. Deimann, W., and Fahimi, H. D. (1979) The appearance of transition forms between monocytes and Kupffer cells in the liver of rats treated with glucan. A cytochemical and ultrastructural study. *J. Exper. Med.*, 149, 883-897.

149. Ashworth et al. (1963) Differences in information content of ribonucleic acids from malignant tissues and homologous organs as expressed by their biological activities. *Expe. Molec. Pathol.*, 1, 96-103.
150. Patchen, M. L., and Lotzova, E. (1980) Modulation of murine hemopoiesis by glucan. *Expe. Hematol.*, 8, 409-422.
151. Arthur, O. T. (2000) Polysaccharide Immunomodulators as Therapeutic Agents: Structural Aspects and Biologic Function. *Clin. Microb. Rev.*, 13, 523–533.
152. Hohl, T. M. (2008) Stage-specific innate immune recognition of *Aspergillus fumigatus* and modulation by echinocandin drugs. *Med. Mycol.*, 1, 1-7.
153. Niskanen, E. O., Burgaleta, C., and Cline, M. J. (1978) Effect of Glucan, a Macrophage Activator, on Murine Hemopoietic Cell Proliferation in Diffusion Chambers in Mice. *Cancer Res.*, 38, 1406-1409.
154. Hohl, T. M., Feldmesser, M., Perlin, D. S., and Pamer, E. G. (2008) Caspofungin Modulates Inflammatory Responses to *Aspergillus fumigatus* through Stage-Specific Effects on Fungal beta-Glucan Exposure. *J Infect Dis.*, 33, 401-413.
155. Kollar, R., Petrakova, E., Ashwell, G., Robbins, P. W., and Cabib, E. (1995) Architecture of the yeast cell wall. The linkage between chitin and $\beta(1\rightarrow3)$ -glucan. *J. Biol. Chem.*, 270, 1170-1178.
156. Kollar, R., Reinhold, B. B., Petrakova, E., Yeh, H. J., Ashwell, G., and Drgonova, J. (1997) Architecture of the yeast cell wall. $\beta(1\rightarrow6)$ -glucan interconnects mannoprotein, $\beta(1\rightarrow3)$ -glucan, and chitin. *J. Biol. Chem.*, 272, 17762-17775.
157. Henrissat, B. (1991) A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.*, 280, 309-316.
158. Nishimura, T., Bignon, C., Allouch, J., Czjzek, M., Darbon, H., Watanabe, T., and Henrissat, B. (2001) *Streptomyces matensis* laminaripentaose hydrolase is an 'inverting' β -1,3-glucanase. *FEBS Lett.*, 499, 187-190.

159. Warren, R. A. (1996) Microbial hydrolysis of polysaccharides. *Annu. Rev. Microbiol.*, 50, 183-212.
160. Stone, B. A., and Clarke, A. E. (1992) Chemistry and Biology of β -1,3-Glucans. Melbourne, Australia: La Trobe University Press.
161. Chothia, C. (1992) One thousand families for the molecular biologist. *Nature*, 357, 543-544.
162. Dan, S., and Marton, I. (1999) Cloning, Expression, Characterization, and Nucleophile Identification of Family 3, *Aspergillus niger* β -glucosidase. *J. Biol. Chem.*, 275, 4973-4980.
163. Henrissat, B. (1991) A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.*, 280, 309-316.
164. Henrissat, B., and Bairoch, A. (1993) New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.*, 293, 781-788.
165. Henrissat, B., and Bairoch, A. (1996) Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. *Biochem. J.*, 316, 695-696.
166. Coutinho, P. M., and Henrissat, B. (1999) In: Recent Advances in Carbohydrate Bioengineering (Gilbert, H., Davies, G, Henrissat, B. and Svensson, B., Eds.), pp. 3-12, The Royal Society of Chemistry, Cambridge.
167. Sinnott, M. L. (1990) Catalytic mechanisms of enzymatic glycosyl transfer. *Chem. Rev.*, 90, 1171-1202.
168. Koshland, D. E. (1953) Stereochemistry and the mechanism of enzymatic reactions. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.*, 28, 416-436.
169. McCarter, J. D., and Withers, S. G. (1994) Mechanisms of enzymatic glycoside hydrolysis. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 4, 885-892.
170. Davies, G., and Henrissat, B. (1995) Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure*, 3, 853-859.

171. Gebler, J., Gilkes, N. R., Claeysens, M., Wilson, D. B., Beugin, P., Wakarchuk, W. W., Kilburn, D. G., Miller Jr., R. C., Warren, R. A., and Withers, S.G. (1992) Stereoselective hydrolysis catalyzed by related beta-1,4-glucanases and beta-1,4-xylanases. *J. Biol. Chem.*, 267, 12559-12561.
172. Armand, S., Tomita, H., Heyraud, A., Gey, C., Watanabe, T., and Henrissat, B. (1994) Stereochemical course of the hydrolysis reaction catalyzed by chitinases A1 and D from *Bacillus circulans* WL-12. *FEBS Lett.*, 343, 177-180.
173. Zechel, D. L., and Withers, S. G. (2000) Glycosidase mechanisms: anatomy of a finely tuned catalyst. *Acc. Chem. Res.*, 33, 11-18.
174. Sinnott, M. L. (1990) Catalytic mechanism of enzymic glycosyl transfer. *Chem. Rev.*, 90, 1171-1202.
175. Wang, Q., Graham, R. W., Trimbur, D., Warren, R. A. J., and Withers, S. G. (1994) Changing Enzymic Reaction Mechanisms by Mutagenesis: Conversion of a Retaining Glucosidase to an Inverting Enzyme. *J. Am. Chem. Soc.*, 116, 11594-11595.
176. Malet, C., Jimenez-Barbero, J., Bernabe, M., Brosa, C., and Planas, A. (1993) Stereochemical course and structure of the products of the enzymic action of endo-1,3-1,4-beta-D-glucan 4-glucanohydrolase from *Bacillus licheniformis*. *Biochem. J.*, 296, 753-758.
177. Barras, F., Bortoli-German, I., Bauzan, M., Rouvier, J., Gey, C., Heyraud, A., and Henrissat, B. (1992) Stereochemistry of the hydrolysis reaction catalyzed by endoglucanase I from *Erwinia chrysanthemi*. *FEBS Lett.*, 300, 145-148.
178. Ishida, T., Fushinobu, S., Kawai, R., Kitaoka, M., Igarashi, K., and Samejima, M. (2009) Crystal structure of glycoside hydrolase family 55 beta-1,3-glucanase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Biol. Chem.*, 284, 10100-10109.
179. Laroche, C., and Michaud, P. (2007) New Developments and Prospective Applications for β -1,3-Glucans. *Recent Pat. Biotechnol.*, 1, 59-73.

180. Kim, B. S., Jung, I. D., Kim, J. S., Lee, J. h., Lee, I. Y., and Lee, K. B. (2000) Curdlan gels as protein drug delivery vehicles. *Biotechnol. Letters*, 22, 1127-1130.
181. Saitô, H., Ohki, T. and Sasaki, T. (1977) A ¹³C Nuclear Magnetic Resonance Study of Gel-Forming (1,3)-β-D-Glucans. Evidence of the Presence of Single-Helical Conformation in a Resilient Gel of a Curdlan-Type Polysaccharide 13140 from *Alcaligenes faecalis var. myxogenes* IFO 13140. *Biochemistry*, 16, 908-914.
182. Garfinkel, A., Kim, Y. H., Voroshilovsky, O., Qu, Z., Kil, J. R., Lee, M. H., Karagueuzian, H. S., Weiss, J. N. and Chen, P. S. (2000) Preventing ventricular fibrillation by flattening cardiac restitution. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 6061–6066.
183. Moracci, M., Trincone, A., Perugino, G., Ciaramella, M., and Rossi, M. (1998) Restoration of the activity of active-site mutants of the hyperthermophilic beta-glycosidase from *Sulfolobus solfataricus*: Dependence of the mechanism on the action of external nucleophiles. *Biochemistry*, 37, 17262-17270.
184. MacLeod, A. M., Tull, D., Rupitz, K., Warren, R. A. J., and Withers, S.G. (1996) Mechanistic consequences of mutation of active site carboxylates in a retaining beta-1,4- glycanase from *Cellulomonas fini*. *Biochemistry*, 35, 13165-13172
185. Wang, Q., Trimbur D., Graham, R., Warren, R. A. J., and Withers, S.G. (1995) Identification of the acid/base catalyst in *Agrobacterium-faecalis* beta-glucosidase by kinetic-analysis of mutants. *Biochemistry*, 34, 14554-14562.
186. Gebler, J. C., Trimbur, D. E., Warren, A. J., Aebersold, R., Namchuk , M., and Withers, S. G. (1995) Substrate-induced inactivation of a crippled beta-glucosidase mutant - identification of the labeled amino-acid and mutagenic analysis of its role. *Biochemistry*, 34, 14547-14553.
187. Viladot, J.L., de Ramon, E., Durany, O., Planas, A. (1998) Probing the mechanism of *Bacillus* 1,3-1,4-beta-D-glucan 4-glucanohydrolases by chemical rescue of inactive mutants at catalytically essential residues. *Biochemistry*, 37, 11332-11342.

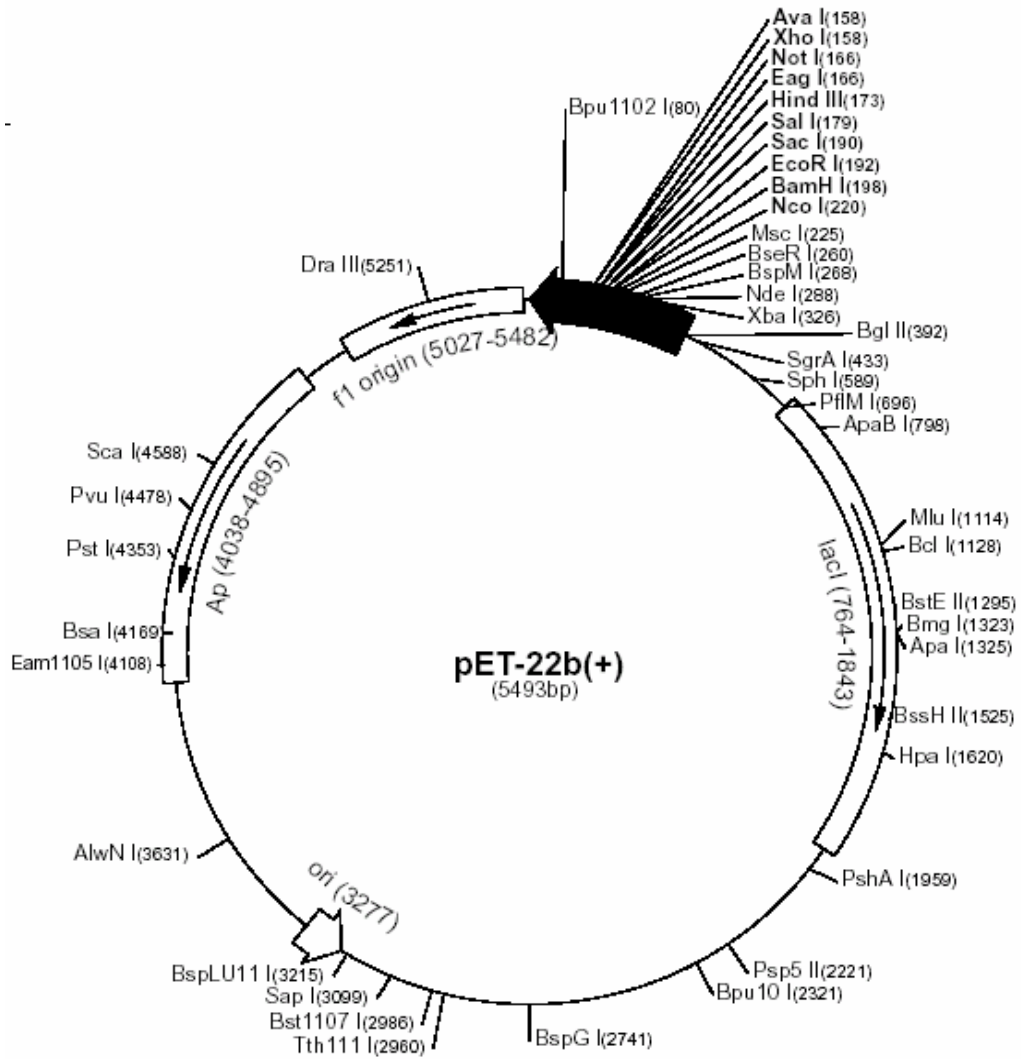
188. Zechel, D.L., and Withers, S.G. (2000) Glycosidase mechanisms: Anatomy of a finely tuned catalyst. *Acc. Chem. Res.*, 33, 11-18.
189. Li, Y.-K., Chir, J., and Chen, F. Y. (2001) Catalytic mechanism of a family 3 β -glucosidase and mutagenesis study on residue Asp247. *Biochem. J.*, 355, 835-840.
190. O'Donnell, A. H., Yao X., and Byers. L. D. (2004) Solvent isotope effects on α -glucosidase. *Biochem. Biophys. Acta*, 1703, 63-67.
191. Edge, M. D., Green, A. R., Meacock, P. A., Schuch, W., Newton, C. R., and Markham, A. F. (1981) Total synthesis of a human leukocyte interferon gene. *Nature*, 292, 756-762.
192. Prodromou, C., and Pearl, L.H. (1992) Recursive PCR: a novel technique for total gene synthesis. *Protein Eng.*, 5, 827-829.
193. 黃心怡 (2002) 交通大學應用化學所碩士論文。
194. 石信德，黃振文。保護植物的重要菌源—2005 年 7 月，391 期：22-27 頁。
195. Nakabayashi, M., Nishijima, T., Ehara, G., Nikaidou, N., Nishihashi, H., and Watanabe, T. (1998) Structure of the gene encoding laminaripentaose-producing β -1,3-glucanase (LPHase) of *Streptomyces matensis* DIC-108. *J. Ferment. Bioeng*, 85, 459-464.
196. Van Duyne, G. D., Standaert, R. F., Karplus, P. A., Schreiber, S. L., and Clardy, J. (1993) Atomic structures of the human immunophilin FKBP-12 complexes with FK506 and rapamycin. *J. Mol. Biol.*, 229, 105-124.
197. Ferrer, P. (2006) Revisiting the *Cellulosimicrobium cellulans* yeast-lytic β -1,3-glucanases toolbox: a review. *Microb. Cell Fact.*, 5, 10-15.
198. DeLano, W. L. The PyMOL Molecular Graphics System. In. San Carlos, CA, USA: DeLano Scientific; 2002.
199. Gouet, P., Courcelle, E., Stuart, D. I., and Metz, F. (1999) ESPript: analysis of multiple sequence alignments in PostScript. *Bioinformatics*, 15, 305-308.

200. Kleywegt, G. J., Jones, T. A. (1997) Defecting Folding Motifs and Similarities in Protein Structures. *Method Enzymol.*, 277, 525-545.
201. Niwa, T., Inouye, S., Tsuruoka, T., Koaze, Y., and Niida, T. (1969) *J. Agr. Biol. Chem.* (Tokyo), 34, 966-970.
202. Reese, E. T., Parrish, F. W., and Ettlinger, M. (1971) Nojirimycin and D-Glucono-1,5-Lactone as inhibitors of carbohydrases. *Carbohydr. Res.*, 18, 381-388.
203. Legler, G., Roeder, K. R., and Illig, H. K., (1979) *Europ. J. Biochem.*, 101, 85-92.
204. Sahm, H., and Schimz, K. L. (1984) Effect of N-methyl-1-deoxy-nojirimycin on the degradation of cellobiose by *Cellulomonas cartalyticum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 20, 54-58.
205. Horikoshi, K. (1942) *J. Biochem.* (Tokyo), 35, 39-42.
206. Legler, G. (1978) Inhibition of β -glucosidases from almonds by cationic and neutral β -glucosyl derivatives. *Biochem. Biophys. Acta*, 524, 94-101.
207. Shulman, S. S. D., and Khorlin, A. (1976) *Biochim. Biophys. Acta*, 445, 169-181.
208. Yariv, J., Wilson, K. J., Hiedelsheim, J. and Blumberg, S. (1971) Labelling of the active site of β -galactosidase by N-bromoacetyl β -D-galactopyranosylamine. *FEBS Lett.*, 15, 24-26.
209. Naider, F., Bohak, Z., and Yariv, J. (1972) Reversible alkylation of a methionyl residue near the active site of β -galactosidase. *Biochemistry*, 11, 3202-3208.
210. Sinnott, M. L., and Smith, P. J. (1978) Affinity labelling with a deaminatively generated carbonium ion. Kinetics and stoichiometry of the alkylation of methionine-500 of the lacZ beta-galactosidase of *Escherichia coli* by beta-D-galactopyranosylmethyl-p-nitrophenyltriazene. *Biochem. J.*, 175, 525-538.
211. Santi, D. V., and Marchant, W. (1973) Affinity labeling of isoleucyl-tRNA synthetase with N-bromoacetylisoleucyl-tRNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 51, 370-377.
212. Janda, K. D., Lo, L. C., Lo, C. H. L., Sim, M. M., Wang, R., Wong, C. H. and Lerner,

- R. A. (1997) Chemical Selection for Catalysis in Combinatorial Antibody Libraries *Science*, 275, 945-948.
213. Shallom, D., Leon, M., Bravman, T., Alon, B. D., Zaide, G., Belakhov, V., and Shoham, Y. (2005) Biochemical Characterization and Identification of the Catalytic Residues of a Family 43 α -D-Xylosidase from *Geobacillus stearothermophilus* T-6. *Biochemistry*, 44, 387-397.
214. Ko, T. P., Day, J., Greenwood, A., and McPherson, A. (1994) Structures of three crystal forms of the sweet protein thaumatin. *Acta Crystallogr D*, 50, 813-825.
215. Higginbotham, J. D. (1986) In: Alternative Sweeteners. Edited by Nabors LO, Gelardi RC. New York: Marcel Dekker, Inc.
216. Witty, M, and Higginbotham, J. D. (Editors) (1994) In: Thaumatin. CRC Press.
217. Kirk, R. E., Othmer, D. F. SWEETENERS. In: Encyclopedia of chemical technology. New York: John Wiley & Sons, Inc.
218. Raka, G. A, and Chakrabarti, C. (2008) Crystal structure analysis of NP24-I: a thaumatin-like protein. *Planta*, 228, 883-890.
219. Horn, S. J., Sikorski, P., Sørlie, M., Vårum K. M., and Vincent, G. H. E. (2006) Endo/exo mechanism and processivity of family 18 chitinases produced by *Serratia marcescens*. *FEBS J.*, 273, 491–503.
220. Umekawa, M., Huang, W., Li, B., Fujita, K., Ashida, H., Wang, L. X., and Yamamoto, K. (2008) Mutants of *Mucor hiemalis* Endo- β -N-acetylglucosaminidase Show Enhanced Transglycosylation and Glycosynthase-like Activities. *J. Biol. Chem.*, 283, 4469-4479.
221. Blanchard, S., Cottaz, S., Coutinho, P. M., Patkar, S., Vind, J., Boer, H., Koivula, A., Driguez, H., and Armanda, S. (2007) Mutation of fungal endoglucanases into glycosynthases and characterization of their acceptor substrate specificity. *J. Mol. Catal. B*, 44, 106–116.

附錄 I-

pET22b(+) 表現載體圖譜



附錄 II- 不同受質的觀測波長以及吸收值變化常數整理

A. 不同 pH 值的 pNPF 觀測波長以及吸收值變化常數

pH	觀測波長 (nm), $\Delta\epsilon$ (M^{-1})
3.5	348, 2980
4.0	348, 3190
4.5	348, 3130
5.0	348, 3050
5.5	348, 3090
6.0	348, 3280
6.5	400, 6040
7.0	400, 10460
7.5	400, 15400

B. 不同受質之觀測波長及吸收值變化常數 (pH6.8, 37°C)

Phenol substituent	pKa	觀測波長 (nm), $\Delta\epsilon$ (M^{-1})
2,4-dinitro	3.96	400, 10910
2,5-dinitro	5.15	440, 4288
3,4-dinitro	5.36	400, 11009
2,4,6-trichloro	6.39	312, 2736
4-chloro-2-nitro	6.45	425, 3546
4-nitro	7.18	400, 7280
2-nitro	7.22	400, 2170
3,5-dichloro	8.19	280, 732
3-nitro	8.39	380, 385
4-cyano	8.49	270, 3101
4-bromo	9.34	288, 680
4-chloro	9.38	278, 580
2-naphthyl	9.51	325, 816
H	9.99	277, 228
4-tert-butyl	10.39	272, 725

附錄 III-

人類組織之 α -L-岩藻糖水解糖苷酶素(Fuc-1)完整人造基因序列:

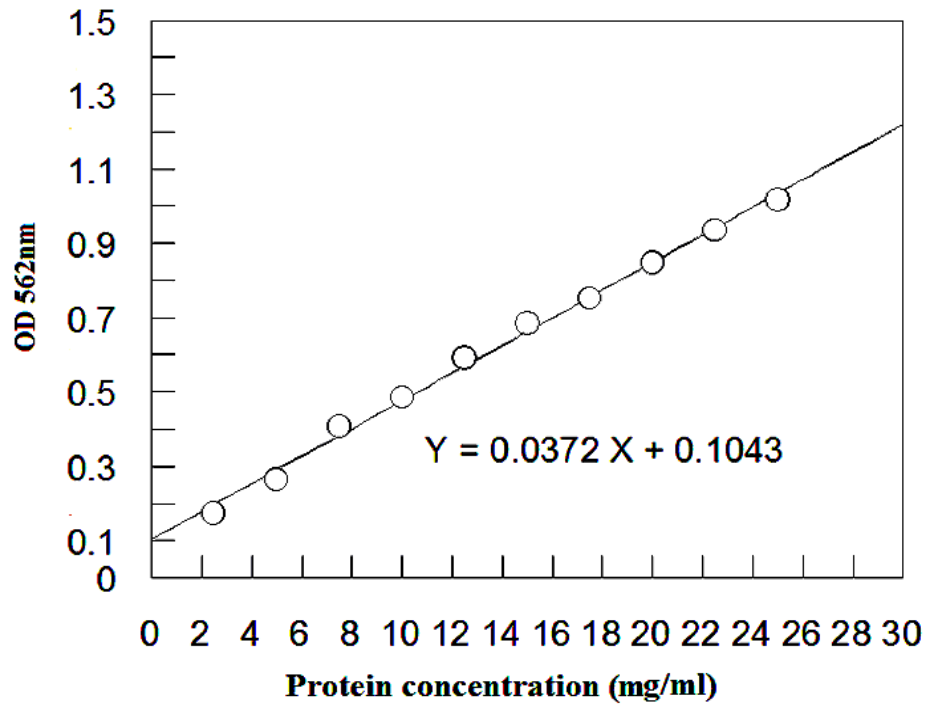
(底線粗黑字體為訊號胜肽 signal peptide)

1	<u>ATG AGG TCG CGG CCG GCG GGT CCC GCG CTG TTG CTG CTG CTG CTC TTC</u>	
	<u>M R S R P A G P A L L L L L L F</u>	16
49	<u>CTC GGA GCG GCC GAG TCG</u> GTG CGT CGG GCC CAG CCT CCG CGC CGC TAC	
	<u>L G A A E S</u> V R R A Q P P R R Y	32
97	ACC CCA GAC TGG CCG AGC CTG GAT TCT CGG CCG CTG CCG GCC TGG TTC	
	T P D W P S L D S R P L P A W F	48
145	GAC GAA GCC AAG TTC GGG GTG TTC ATC CAC TGG GGC GTG TTC TCG GTG	
	D E A K F G V F I H W G V F S V	64
193	CCC GCC TGG GGC AGC GAG TGG TTC TGG TGG CAC TGG CAG GGC GAG GGG	
	P A W G S E W F W W H W Q G E G	80
241	CGG CCG CAG TAC CAG CGC TTC ATG CGC GAC AAC TAC CCG CCC GGC TTC	
	R P Q Y Q R F M R D N Y P P G F	96
289	AGC TAC GCC GAC TTC GGA CCG CAG TTC ACT GCG CGC TTC TTC CAC CCG	
	S Y A D F G P Q F T A R F F H P	112
337	GAG GAG TGG GCC GAC CTC TTC CAG GCC GCG GGC GCC AAG TAT GTA GTT	
	E E W A D L F Q A A G A K Y V V	128
385	TTG ACG ACA AAG CAT CAC GAA GGC TTC ACA AAC TGG CCG AGT CCT GTG	
	L T T K H H E G F T N W P S P V	144
433	TCT TGG AAC TGG AAC TCC AAA GAC GTG GGG CCT CAT CGG GAT TTG GTT	
	S W N W N S K D V G P H R D L V	160
481	GGT GAA TTG GGA ACA GCT CTC CGG AAG AGG AAC ATC CGC TAT GGA CTA	
	G E L G T A L R K R N I R Y G L	176
529	TAC CAC TCA CTC TTA GAG TGG TTC CAT CCA CTC TAT CTA CTT GAT AAG	
	Y H S L L E W F H P L Y L L D K	192
577	AAA AAT GGC TTC AAA ACA CAG CAT TTT GTC AGT GCA AAA ACA ATG CCA	
	K N G F K T Q H F V S A K T M P	208
625	GAG CTG TAC GAC CTT GTT AAC AGC TAT AAA CCT GAT CTG ATC TGG TCT	
	E L Y D L V N S Y K P D L I W S	224

673 GAT GGG GAG TGG GAA TGT CCT GAT ACT TAC TGG AAC TCC ACA AAT TTT
 D G E W E C P D T Y W N S T N F 240
 721 CTT TCA TGG CTC TAC AAT GAC AGC CCT GTC AAG GAT GAG GTG GTA GTA
 L S W L Y N D S P V K D E V V V 256
 769 AAT GAC CGA TGG GGT CAG AAC TGT TCC TGT CAC CAT GGA GGA TAC TAT
 N D R W G Q N C S C H H G G Y Y 272
 817 AAC TGT GAA GAT AAA TTC AAG CCA CAG AGC TTG CCA GAT CAC AAG TGG
 N C E D K F K P Q S L P D H K W 288
 865 GAG ATG TGC ACC AGC ATT GAC AAG TTT TCC TGG GGC TAT CGT CGT GAC
 E M C T S I D K F S W G Y R R D 304
 913 ATG GCA TTG TCT GAT GTT ACA GAA GAA TCT GAA ATC ATT TCG GAA CTG
 M A L S D V T E E S E I I S E L 320
 961 GTT CAG ACA GTA AGT TTG GGA GGC AAC TAT CTT CTG AAC ATT GGA CCA
 V Q T V S L G G N Y L L N I G P 336
 1009 ACT AAA GAT GGA CTG ATT GTT CCC ATC TTC CAA GAA AGG CTT CTT GCT
 T K D G L I V P I F Q E R L L A 352
 1057 GTT GGG AAA TGG CTG AGC ATC AAT GGG GAG GCT ATC TAT GCC TCC AAA
 V G K W L S I N G E A I Y A S K 368
 1105 CCA TGG CGG GTG CAA TGG GAA AAG AAC ACA ACA TCT GTA TGG TAT ACC
 P W R V Q W E K N T T S V W Y T 384
 1153 TCA AAG GGA TCG GCT GTT TAT GCC ATT TTT CTG CAC TGG CCA GAA AAT
 S K G S A V Y A I F L H W P E N 400
 1201 GGA GTC TTA AAC CTT GAA TCC CCC ATA ACT ACC TCA ACT ACA AAG ATA
 G V L N L E S P I T T S T T K I 416
 1249 ACA ATG CTG GGA ATT CAA GGA GAT CTG AAG TGG TCC ACA GAT CCA GAT
 T M L G I Q G D L K W S T D P D 432
 1297 AAA GGT CTC TTC ATC TCT CTA CCC CAG TTG CCA CCC TCT GCT GTC CCC
 K G L F I S L P Q L P P S A V P 448
 1345 GCA GAG TTT GCT TGG ACT ATA AAG CTG ACA GGA GTG AAG TAA
 A E F A W T I K L T G V K - 461

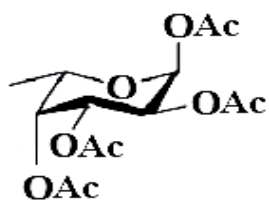
附錄 IV-

下圖為蛋白質標準品，各不同濃度所相對 OD₅₆₂ 吸收值之標準檢量線。

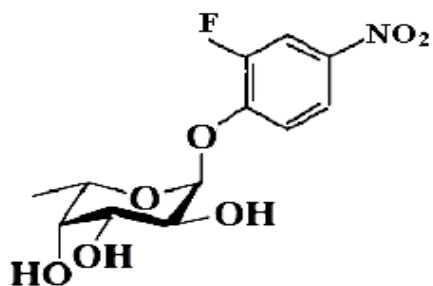


附錄 V-

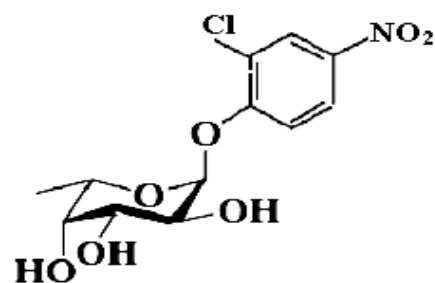
各芳香類- α -L-岩藻糖糖苷化合物之結構



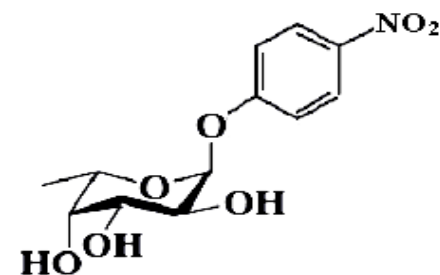
(1) TAF



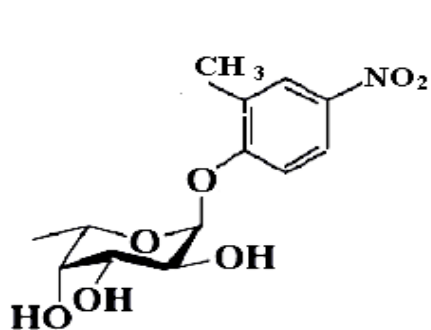
(2) FNPF



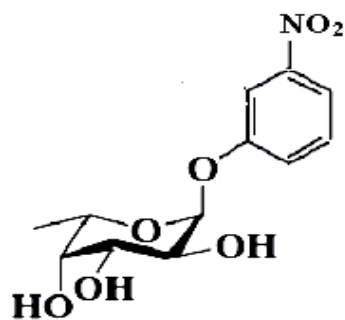
(3) CNPF



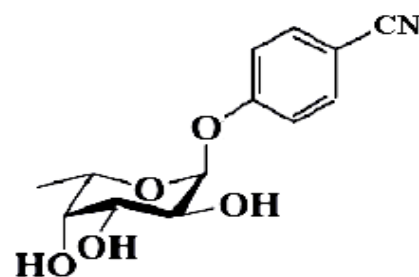
(4) pNPF



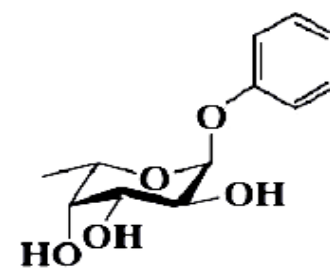
(5) MeNPF



(6) mNPF

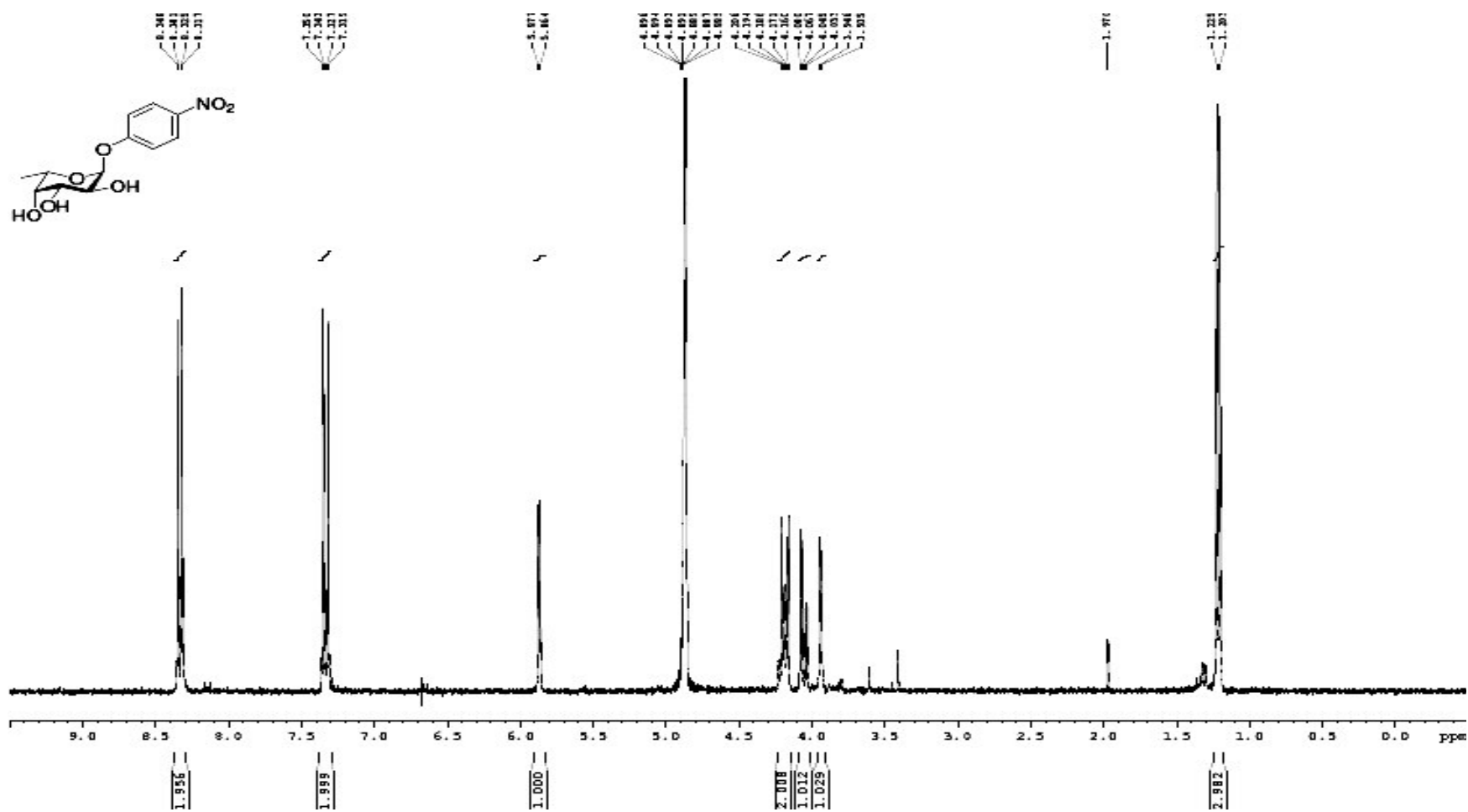


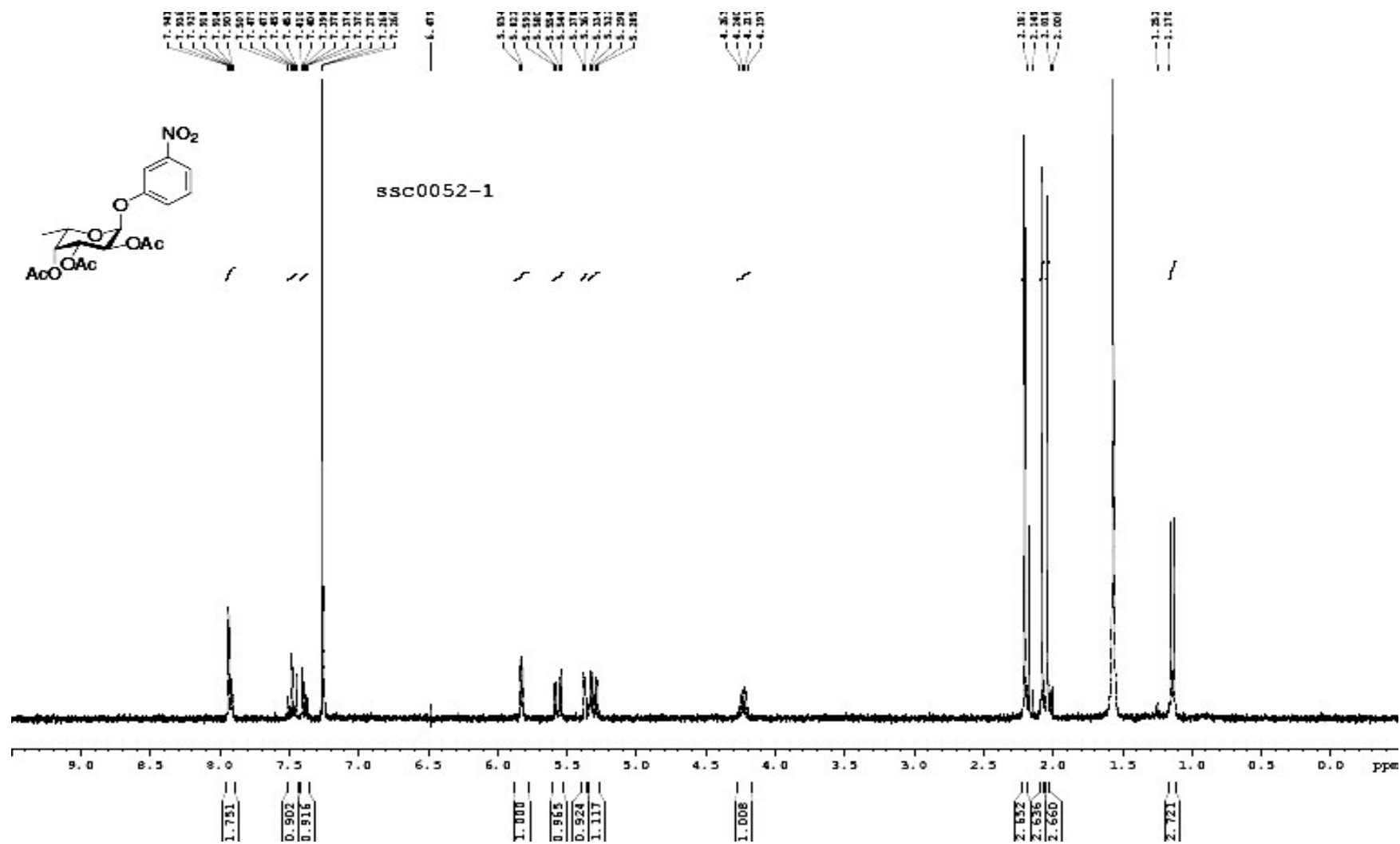
(7) pCPF

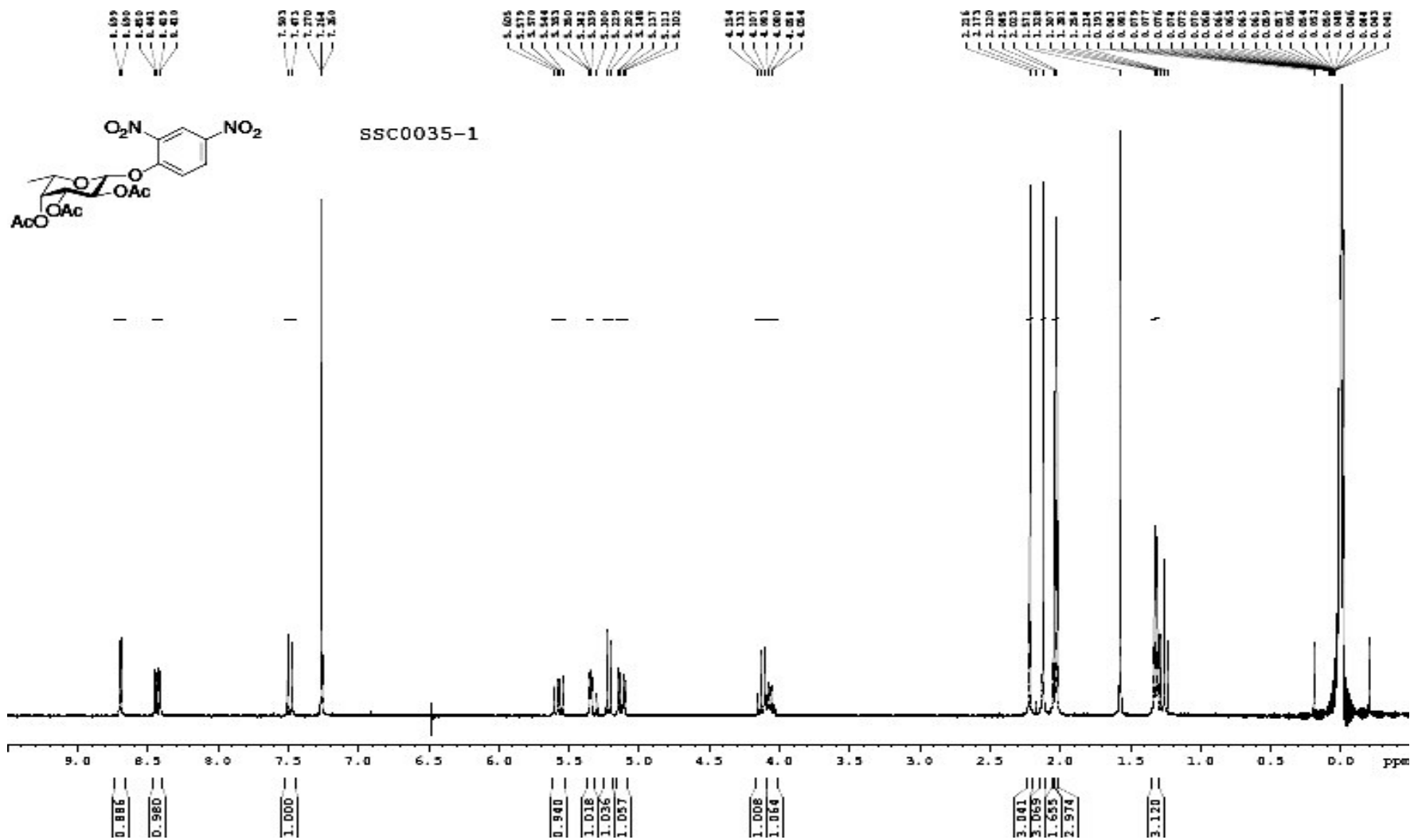


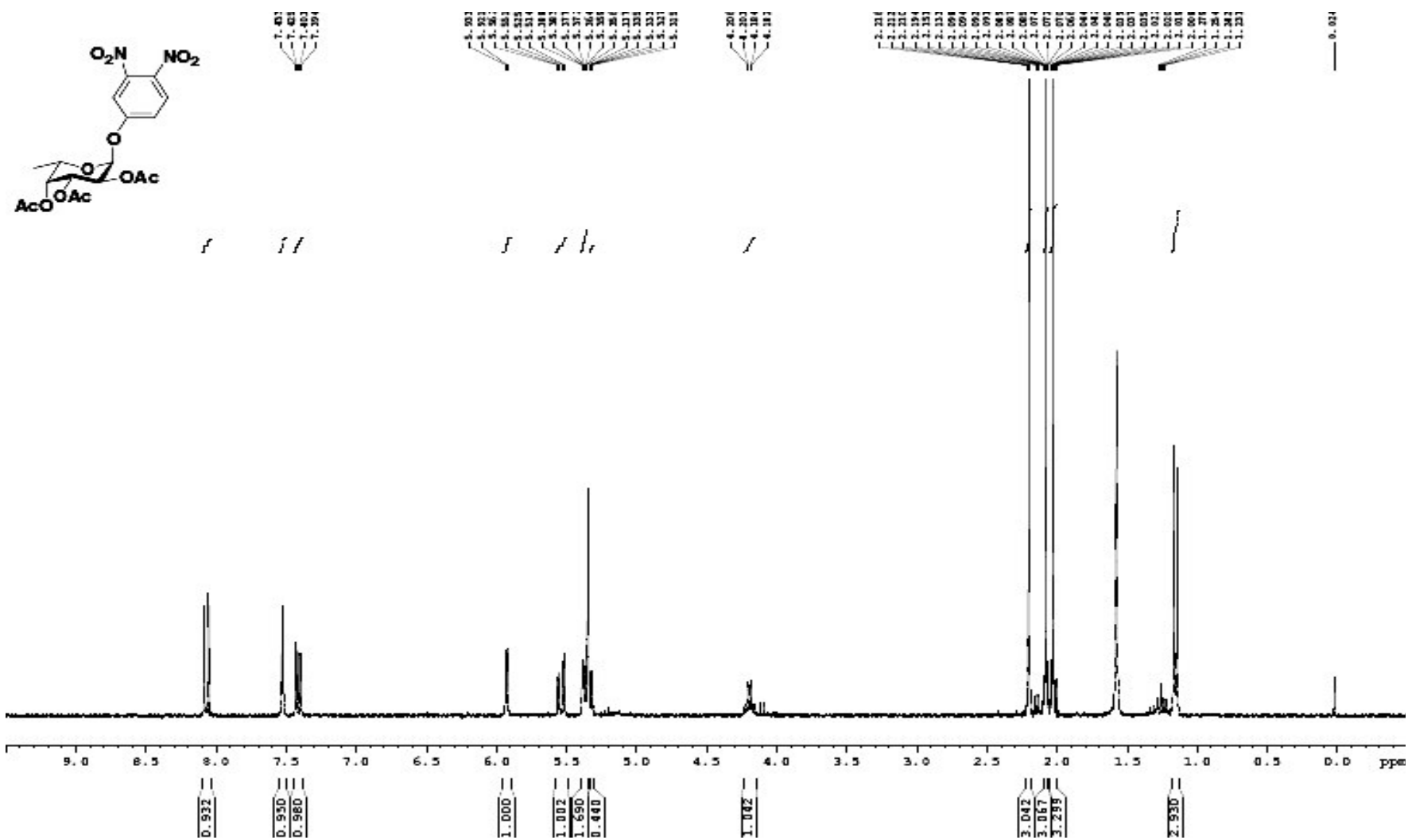
(8) PF

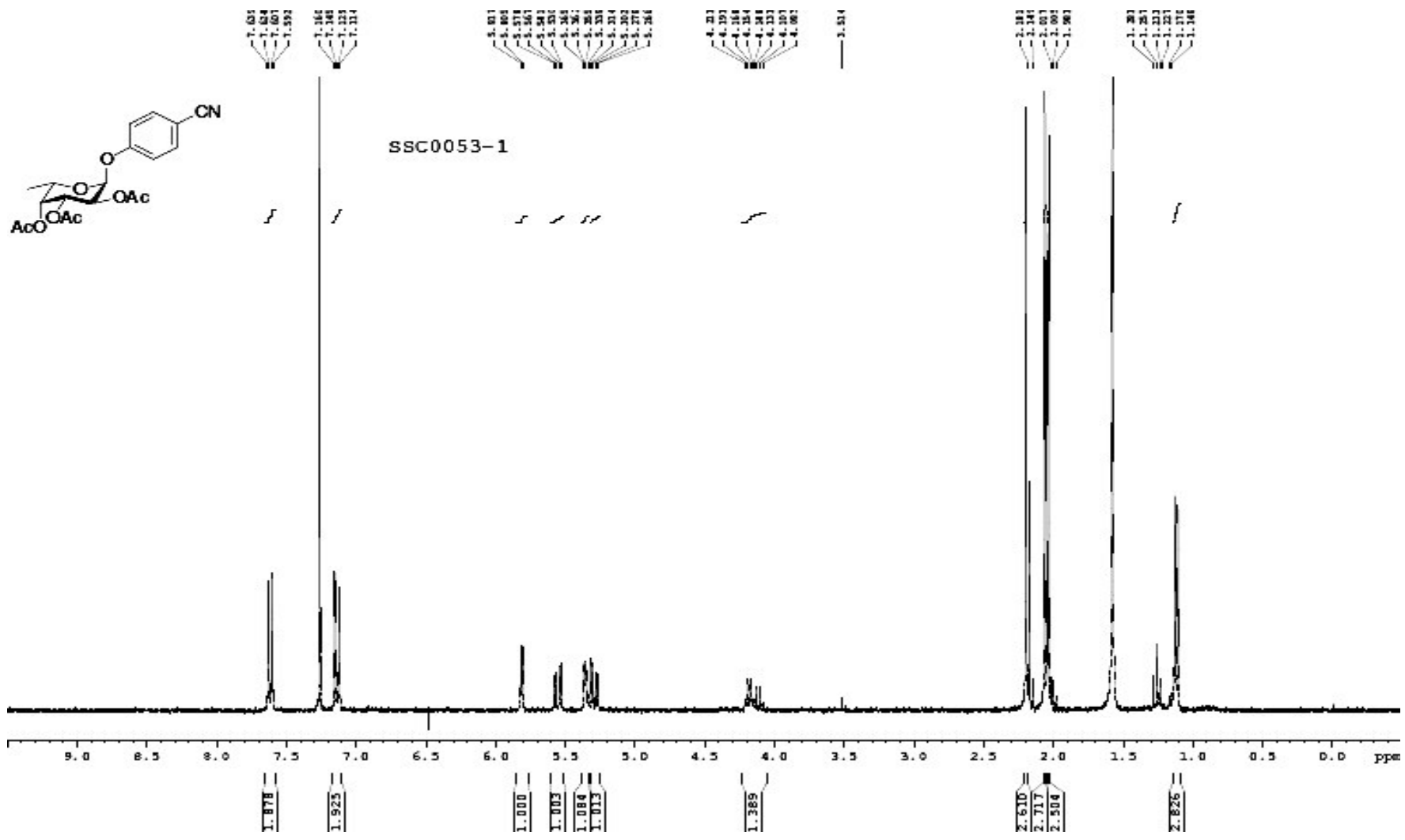
附錄 VI- 合成受質與抑制劑的 NMR 光譜

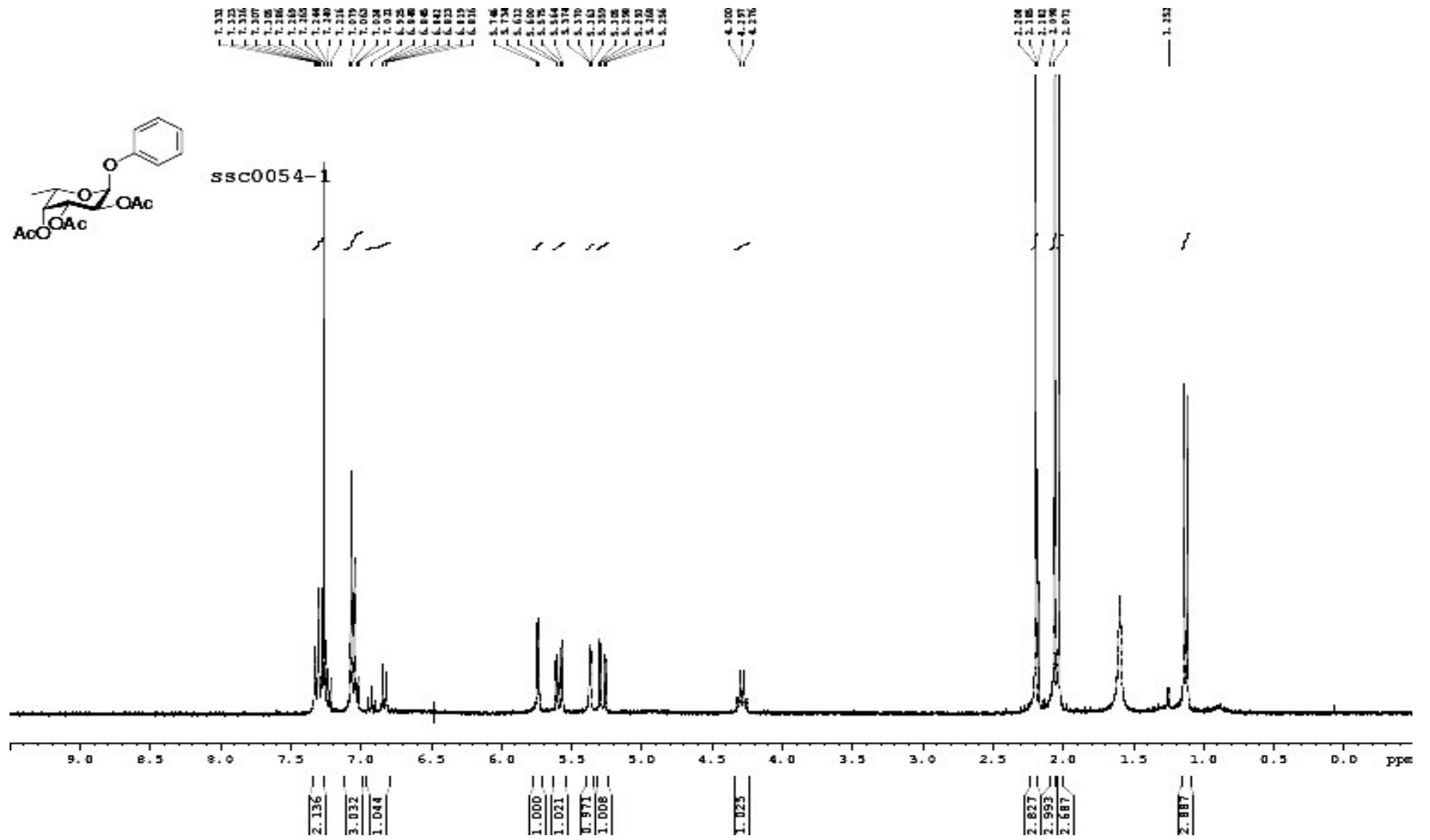


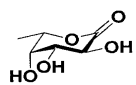




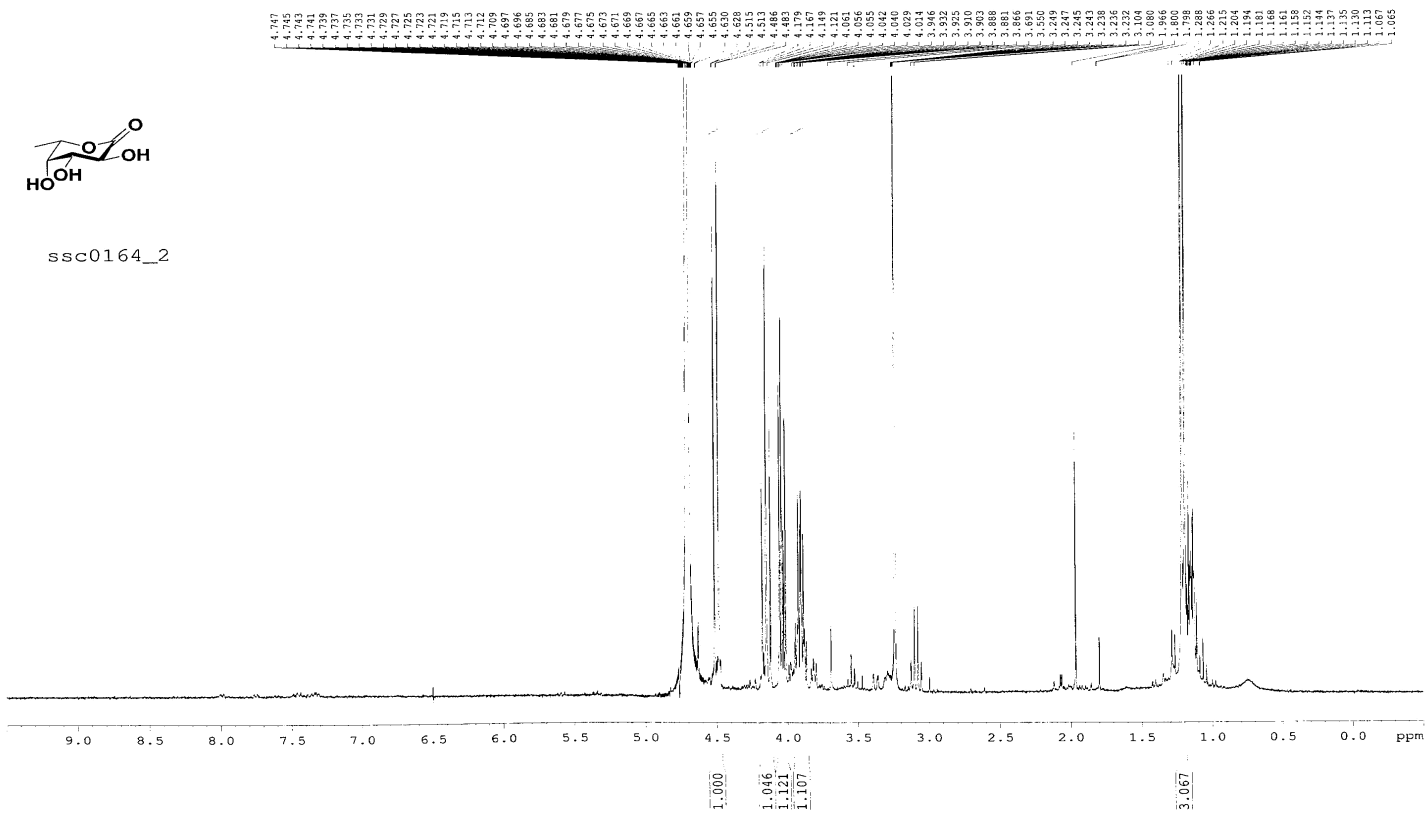








ssc0164_2



附錄 VII-

CLUSTAL W (1.81) multiple sequence alignment of *Thermotoga_maritima* 、 *Homo_sapiens* (Human) 、*Sulfolobus_solfataricus*

* single, fully conserved residue : conservation of strong groups
 . conservation of weak groups - no consensus

Thermotoga_maritima -----MISMKPRYKPDWESLREHTVPKWFDK
Homo_sapiens (Human) MRSRPAGPALLLLLLFLGAAESVRRRAQPPRRYTPDWPSLDSRPLPAWFDE
Sulfolobus_solfataricus -----

Thermotoga_maritima AKFGIFIHGVIYSVPGWATPTGELGKVPMDAWFFQNPYAEWYENSLRIKE
Homo_sapiens (Human) AKFGVFIHWGVFSVPAWGS-----EWFWWHWQGEGRPQYQRFMR
Sulfolobus_solfataricus -----

Thermotoga_maritima SPTWEYHVKTYGENFEYEKFADLFTA EKWDPQEWADLFKKAGAKYVIPTT
Homo_sapiens (Human) -----DNYPFGFSYADFGPQFTARFFHPEEWADLFQAAGAKYVVLTT
Sulfolobus_solfataricus -----MFTGENWDPYEWAKVFKKSGAKFVVLVA
 . . :.* *. :* :***:* : :

Thermotoga_maritima KHHDGFCLWG-TKYTDFNSVKRGPKRDLVGD LAKAVREAGLRFVYYSGG
Homo_sapiens (Human) KHHEGFTNWPSVSWNWN SKDVGPHRDLV GELGTALRKRNI RYGLYHS-L
Sulfolobus_solfataricus EHHDGFALWES-NYTRWCATKIGPKRDIVRELKEAVEGQGLIFGISYHRA
 :**:** * : . . **:**:* :* *. . : :* : :

Thermotoga_maritima LDWRFTEPIRYPEDLSY-----IRPNTYEY
Homo_sapiens (Human) LEWFHP---LYLLDKKN-----GFKTQHFV
Sulfolobus_solfataricus EHWWFFDQGMKIESDVKDPRYLDLYGPAQSASLNPRDPPSLDNVQPND E F
 .* . * .

Thermotoga_maritima ADYAYKQVMELVDLYLPDVLW^{nucleophile}NDMGWPE-KGKEDLKYLFAYYYNKHP---
Homo_sapiens (Human) SAKTMPELYDLVNSYKPDLIWSDGEWECPTYWNSTNFLSWLYNDSPVK-
Sulfolobus_solfataricus LMDWLLRIVEAVEKYRPWL VYFDWWIANPSFQPYLKAFASYYNRSYKWG
 . : : * : * * : : * . . : : * *

Thermotoga_maritima -EGSVNDRWGVPHWDFKTAEYHVN---YPGDLPGYKWEFTRGIG-LSFGY
Homo_sapiens (Human) DEVVVNDRWQNSSCHHGGYNCEDKFKPQSLPDHKWEMCTSIDKFSWGY
Sulfolobus_solfataricus IEPV I IYKQG--AFGEGTAIPDLAERGTIKNVYPSTWLADTSIDYKSWGY
* : : * . . . : . * . * . * : **

Thermotoga_maritima NRNEGPEHMLSVEQLVYTLVDVVS KGGNLLLNVGPKGDGTIPDLQKERLL
Homo_sapiens (Human) RRDMA LSDVTEESEI ISELVQTVSLGGNYLLNIGPTKGLIVPIFQERLL
Sulfolobus_solfataricus IKD---AEYKLPSVILSHLGDVVS KNGVFLNIGPKADGTIPEEAKRILL
: : . . : : * : . * * * * : * * * * : . * *

Thermotoga_maritima GLGEWLRKYGD AIYGT SVWERC-----CAKTEDGTEIRFT
Homo_sapiens (Human) AVGWLS INGEAIYASKPWR-----VQWEKNTTSVWYT
Sulfolobus_solfataricus DVGDWLNVNGEAI FGSKPWRVYGE GPGS GINEGGFFTERKITLGYQDVRYT
: * . * * : * * : . . * . . : : * :

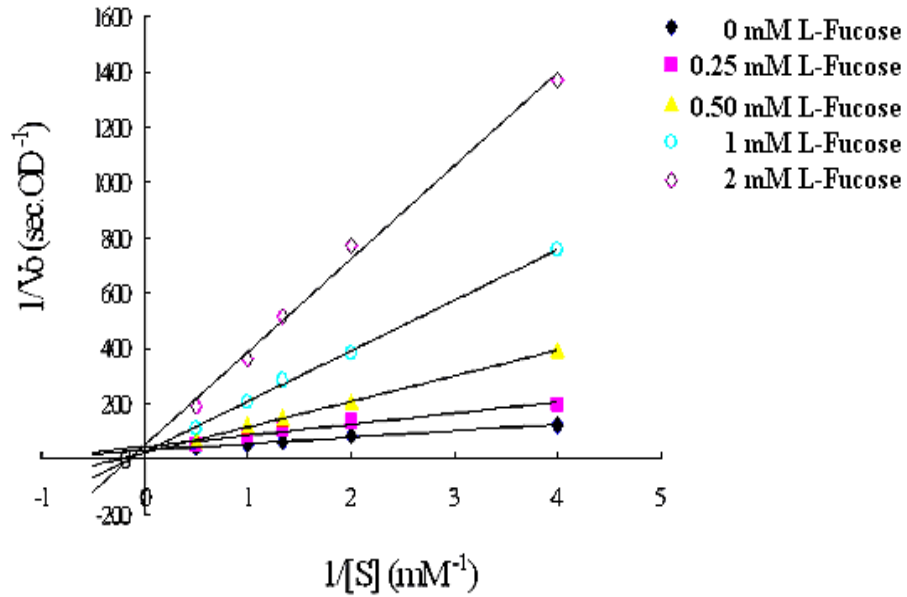
Thermotoga_maritima RK-----CNRIFVIFLGIPT-----GEKIVIEDLNLSAGTVRHFL--TGE
Homo_sapiens (Human) SK-----GSAVYAI FLHWPE-----NGVLNLESPITTSTTKITMLGIQGD
Sulfolobus_solfataricus VKDYYPQR RH IYAILFGKPK EITLRSFMKNLKLIEEAVIVDVSRLDGK GK
* : . * : : * . : : : . * *

Thermotoga_maritima RLSFKNVGKNLEITVPKKLLETDSITLVLEAVEE---
Homo_sapiens (Human) LKWSTDPDKGLFISLPQLPPSAVPAEFAWTIKLTGVK
Sulfolobus_solfataricus LEWSLS-DEGLKIKIEEVIRAPLVIRVILDYR-----

附錄 VIII-

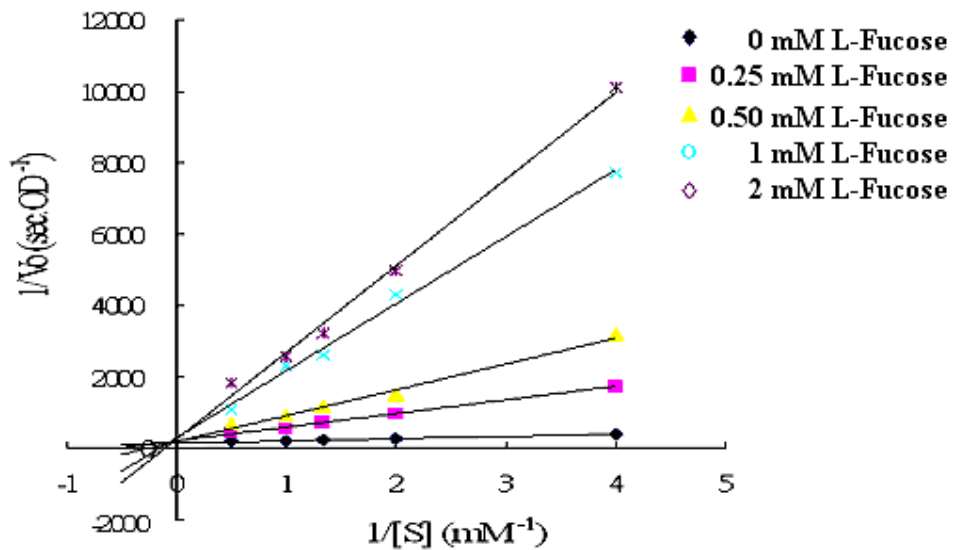
L-Fucose 和 1-Methyl- α -L-Fucose 對野生株 *h*-Fuc 之競爭抑制作用

(1)



以雙倒數作圖，求其不同濃度 L-Fucose 對野生株 *h*-Fuc 酵素之競爭抑制作用

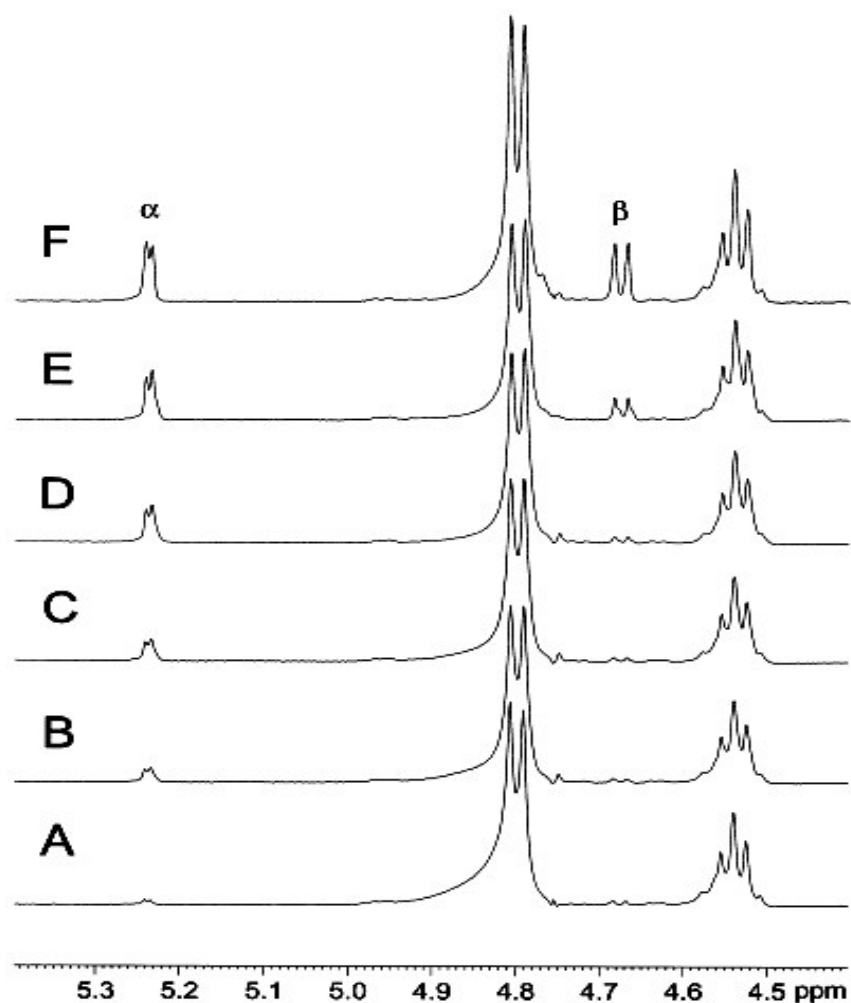
(2)



以雙倒數作圖，求不同濃度 1-Methyl- α -L-Fucose 對野生株 *h*-Fuc 酵素之競爭抑制作用

附錄 IX-

以氫核磁共振儀($^1\text{H-NMR}$)追縱 LPHase 酵素催化反應立體
選擇性(*本圖譜摘錄至文獻 43)



酵素 LPHase 催化水解 laminarin 反應作用的 $^1\text{H-NMR}$ 光譜圖。A: 未加酵素的起始受質反應物；B~F: 分別為加入酵素後水解反應 6min、12min、30min、150min 和 72h 後的光譜訊號圖譜。可發現 α -form 的 β -1,3-葡聚五糖先產生，而後在溶液中進行 mutarotation 而形成 β -form 的 β -1,3-葡聚五糖。

附錄 X-

CLUSTAL W (1.81) multiple sequence alignment of *Cellulosimicrobium cellulans* (又名 *Oerskovia xanthineolytica*)、*Arthrobacter sp. YCWD3* and *S. matensis DIC108*

(位於序列之 C 端粗黑字體為 I 型態的凝血素區域 (Lectin-like domain))

*** single, fully conserved residue : conservation of strong groups**
. conservation of weak groups - no consensus

<i>Oerskovia xanthineolytica</i>	MPHDRKNSSRRAWAALCAAVLAVSG--ALVGVAAPAS-AVPATIPLTITNDSGRGP-IYL
<i>Arthrobacter sp. YCWD3</i>	MPHDRKNSSRRAWAALCAAVLAVSG--ALVGVAAPAS-AVPATIPLTITNDSGRGP-IYL
<i>S. matensis DIC108</i>	MLRTLRL---RRVTAVALGLATALGGWLAAGVPSPAHAAVPATIPLTITNNSGRAEQIHI
	* : : ** * . . * . * . ** : ** ***** : ** . * :
<i>Oerskovia xanthineolytica</i>	YVLG--ERDGVAGWADAGGTFHPWPGGVGPVVPAPDASIAGPGGQSVTIRLPKLSGRV
<i>Arthrobacter sp. YCWD3</i>	YVLG--ERDGVAGWADAGGTFHPWPGGVGPVVPAPDASIAGPGGQSVTIRLPKLSGRV
<i>S. matensis DIC108</i>	YNLGTLSRQGWADASGAFHPWPAGGNP-PTPAPDASIPGPAPGRSTTIQIPKFSGRI
	* * * . * ***** * : ***** * . * * . ***** . * . * : * : * : * :
<i>Oerskovia xanthineolytica</i>	YYSYGQKMTFQIVLDGRLVQPAVQNDSDPNRNILFNWTEYTLNDGGLWINSTQVDHWSAP
<i>Arthrobacter sp. YCWD3</i>	YYSYGQKMTFQIVLDGRLVQPAVQNDSDPNRNILFNWTEYTLNDGGLWINSTQVDHWSAP
<i>S. matensis DIC108</i>	YFSYGRKMEFRLTTGG-LVQPAVQNPTDPNRDILFNWSEYTLNDSGLWINSTQVDMFSAP
	* : * : * * * : * : . * ***** : * : * : * : * : * : * : * : * : * :
<i>Oerskovia xanthineolytica</i>	YQVGVRADGQVLSTGMLKPNGYEAFYTALEG--AGWGGLVQRAPDGSRLRALNPESHGID
<i>Arthrobacter sp. YCWD3</i>	YQVGVRADGQVLSTGMLKPNGYEAFYTALES--AGWGGLVQRAPDGSRLRALNPESHGID
<i>S. matensis DIC108</i>	YTVGVRRGDGTTLSTGKLKPGYNGVFNALRGQSGGWANLIQTRSDGTVLRALSPYGVGE
	* * * : * . * * . * * * * * : * . * * : . . * . . . * . . * . * : * * * : * * * : * :
<i>Oerskovia xanthineolytica</i>	VGKISSASIDSYVTEVWNSYRTRDMVVTTPFSHEPGTQFRGRVDGDWFRFRSGSQEVAAF
<i>Arthrobacter sp. YCWD3</i>	VGKISSASIDSYVTEVWNSYRTRDMCVTPFSHEPGTQFRGRVDGDWFRFRNGSQEVAAF
<i>S. matensis DIC108</i>	TGALPASVMDYINRVWNKYTGTDLIVTPFADRPDVRTGRVSGGLRFTDGSQAVVTTF
	. * . : : * . * : . * * * . * * : * * * : . * . : : * * . * . * * * : * : *

Oerskovia xanthineolytica KKPDASSVYGCHKDLQAPNDHVVGPIARTLCAALVRTTALTNPQPANSAGFYQDARTN
Arthrobacter sp. YCWD3 KKPDASSVYGCHKDLQAPNDHVVGPIARTLCAALVRTTALTNPQPANSAGFYQDARTN
S. matensis DIC108 QKPDASSVFGCHRLLDAPNDQVRGPISRITLCAGFNRTLLANPHQPDRSAAGFYQEPVTN
 :*****:***: *:*:*:* *:*:*:*:*: : ** *:*:*:* .:*****: *

Oerskovia xanthineolytica VYAKLAHQQMANGKAYAFADFDDVGAHESLVHDGNPQAAYIKLDPFTGTATPLGNGGSTEQ
Arthrobacter sp. YCWD3 VYAKLAHQQMANGKAYAFADFDDVGAHESLVHDGNPQAAYIKLDPFTGTATPIANGGSTEQ
S. matensis DIC108 HYARI IHAHMADGKAYGFADFDDVGHESLVHDGDPGASLTLDPPD-----
 : : * :*:*.***** *****:*. * .:****

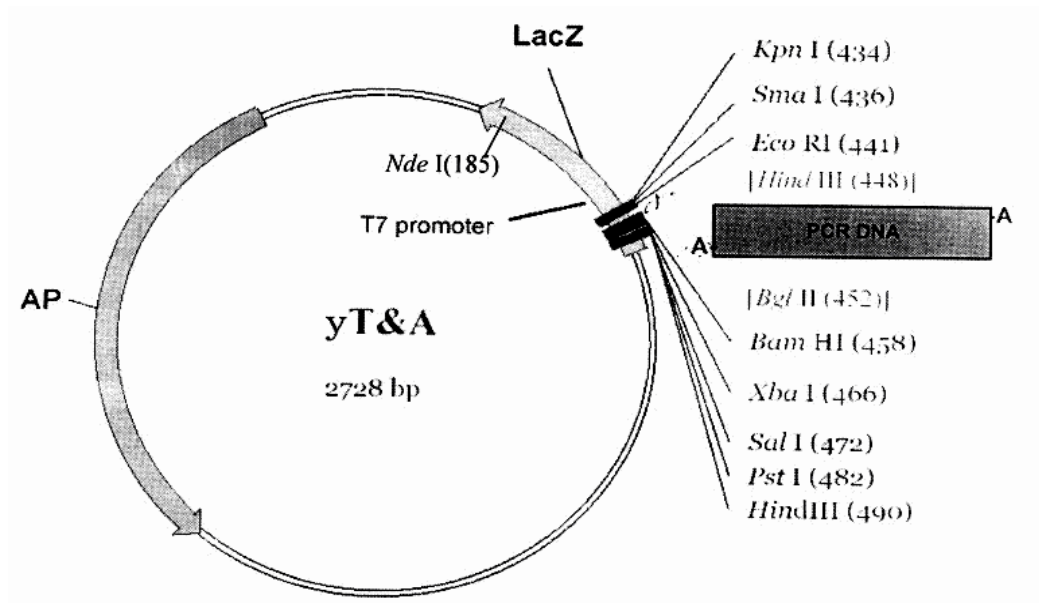
Oerskovia xanthineolytica PGTPGGLPAGTGALRIGSTLCLDVPWADPTDTNQVLATCSGNAQQWTRGTDGTVRALG
Arthrobacter sp. YCWD3 PGTPGGLPAGTGALRIGSTLCLDVPWADPTDTNQVLATCSGNAQQWTRGTDGTVRALG
S. matensis DIC108 -----

Oerskovia xanthineolytica KCLDVARSGTADGTAVWIYTCNGTGAQKWTYDSATKALRNPQSGKCLDAQGGAPLRDGGK
Arthrobacter sp. YCWD3 KCLDVARSGTADGTAVWIYTCNGTGAQKWTYDSATKALRNPQSGKCLDAQGGAPLRDGGK
S. matensis DIC108 -----

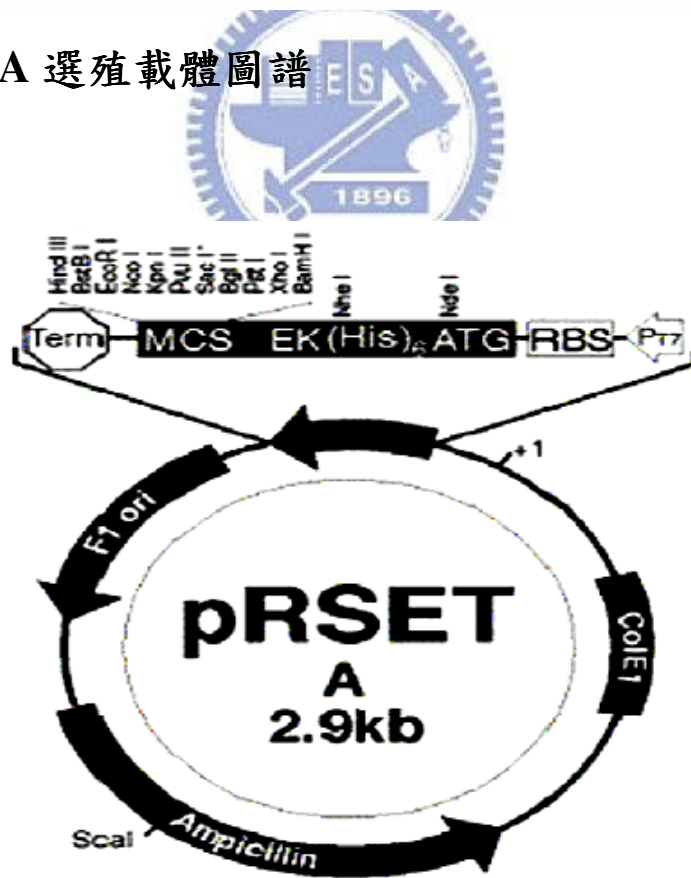
Oerskovia xanthineolytica VQLWTCNQTEAQRWTL
Arthrobacter sp. YCWD3 VQLWTCNQTEAQRWTL
S. matensis DIC108 -----



附錄 XI-



(A) yT&A 選殖載體圖譜



(B) pRSET_A 表現載體圖譜

附錄 XII-

β -1,3-葡聚五糖生產水解糖苷酵素之完整人造基因與胺基酸序列:

(底線粗黑字體為訊號胜肽 signal peptide)

1 ATG CTG CGC ACT CTC AGA CGC CGG GTC ACC GCC GTG GCG CTG GGC CTC GCC ACC
M L R T L R R R V T A V A L G L A T 18

55 GCG CTG GGC GGC GGC TGG CTC GCC GCC GGG GTC CCG TCC CCG GCG CAC GCC GCG
A L G G G W L A A G V P S P A H A A 36

109 GTC CCT GCC ACG ATT CCG CTG ACC ATC ACG AAC AAC TCG GGT CGC GCA GAG CAG
V P A T I P L T I T N N S G R A E Q 54

163 ATC CAT ATC TAC AAC CTG GGG ACC GAG CTC TCG TCT GGT CGC CAA GGA TGG GCT
I H I Y N L G T E L S S G R Q G W A 72

217 GAC GCC AGT GGG GCA TTC CAT CCG TGG CCA GCA GGT GGG AAT CCT CCT ACT CCA
D A S G A F H P W P A G G N P P T P 90

271 GCT CCA GAT GCC TCC ATC CCT GGT CCT GCT CCG GGT CGC TCC ACC ACC ATC CAA
A P D A S I P G P A P G R S T T I Q 108

325 ATC CCC AAG TTC TCT GGC CGC ATC TAC TTC TCG TAC GGG CGC AAG ATG GAG TTC
I P K F S G R I Y F S Y G R K M E F 126

379 CGA CTG ACT ACC GGT GGC CTC GTG CAG CCC GCC GTA CAG AAC CCG ACT GAC CCG
R L T T G G L V Q P A V Q N P T D P 144

433 AAC CGC GAC ATC CTC TTC AAC TGG TCC GAG TAC ACG CTC AAC GAT TCC GGG CTC
N R D I L F N W S E Y T L N D S G L 162

487 TGG ATC AAC AGT ACG CAG GTC GAT ATG TTC TCA GCT CCC TAC ACG GTG GGT GTG
W I N S T Q V D M F S A P Y T V G V 180

541 CGC CGC GGT GAC GGG ACT ACA CTG AGT ACT GGT AAA CTT CGC CCT GGC GGG TAC
R R G D G T T L S T G K L R P G G Y 198

595 AAC GGT GTG TTC AAT GCG CTC AGA GGA CAG TCT GGC GGA TGG GCT AAC CTC ATT
N G V F N A L R G Q S G G W A N L I 216

649 CAG ACG CGA TCC GAT GGT ACC GTG CTT CGA GCG CTC TCT CCA CTC TAT GGT GTC
Q T R S D G T V L R A L S P L Y G V 234

703 GAG ACA GGT GCC CTC CCG GCC TCA GTC ATG GAC GAC TAC ATC AAC CGT GTC TGG
E T G A L P A S V M D D Y I N R V W 252

757 AAC AAG TAC ACA GGT ACC GAT CTC ATA GTC ACC CCC TTC GCC GAT CGT CCT GAC
N K Y T G T D L I V T P F A D R P D 270

801 GTG CGC TAC ACT GGT CGC GTC TCT GGA GGT GTC CTG CGG TTC ACT GAT GGG TCC
 V R Y T G R V S G G V L R F T D G S 288
 855 GGT GCA GTC GTC ACT ACA TTC CAG AAG CCA GAT GCC TCC TCA GTA TTT GGG TGC
 G A V V T T F Q K P D A S S V F G C 306
 909 CAC CGC CTC CTC GAC GCC CCG AAT GAC CAG GTA CGC GGA CCC ATC TCT CGT ACG
 H R L L D A P N D Q V R G P I S R T 324
 963 CTC TGT GCG GGC TTC AAC CGT ACC ACC CTG CTC GCC AAC CCA CAT CAG CCT GAC
 L C A G F N R T T L L A N P H Q P D 342
 1017 CGT AGC GCA GCG GGA TTC TAC CAG GAG CCG GTC ACG AAT CAC TAC GCG CGG ATC
 R S A A G F Y Q E P V T N H Y A R I 360
 1071 ATA CAT GCA CAC ATG GCG GAC GGT AAG GCG TAC GGC TTC GCA TTC GAC GAC GTG
 I H A H M A D G K A Y G F A F D D V 378
 1125 GGA CAT CAC GAG TCT CTG GTA CAT GAC GGT GAC CCT CGC GGT GCC TCT CTG ACG
 G H H E S L V H D G D P R G A S L T 396
 1179 CTC GAC CCG TTC GAC TGA
 L D P F D - 401



附錄 XIII-

β -1,3-葡聚五糖生產水解糖苷酵素之人造基因與 *Streptomyces matensis* DIC-108 原生基因之鹼基序列比對。(* 代表兩比對後彼此間相同之鹼基)

Artific_gene -----
Streptomyces matensis ATGCTGCGCACTCTCAGACGCCGGGTCACCGCCGTGGCGCTGGGCCTCGC

Artific_gene -----
Streptomyces matensis CACCGCGCTGGGCGCGGCTGGCTCGCCGCCGGGTCCCCTCCCCGGCGC

Artific_gene --ATGGCGTCCCTGCCACGATTCCGCTGACCATCACGAACAACCTCGGGT
Streptomyces matensis ACGCCGCGTCCCGCCACCATCCGCTGACCATACCAACAACCTCGGGC

***** ** *****

Artific_gene CGCGCAGAGCAGATCCATATCTACAACCTGGGACCGAGCTCTCGTCTGG
Streptomyces matensis CGCGCCGAACAGATCCACATCTACAACCTCGGCACCGAGCTGTCTCCGG

***** ** ***** ** ***** ** ***** **

Artific_gene TCGCCAAGGATGGGCTGACGCCAGTGGGCATTCCATCCGTGGCCAGCAG
Streptomyces matensis CCGGCAGGGCTGGGCCGACGCGAGCGGCGCCTCCACCCCTGGCCCGCGG

** ** * ***** ** * * ***** ** ***** **

Artific_gene GTGGAATCCTCTACTCCAGTCCAGATGCCTCCATCCCTGGTCTCTGCT
Streptomyces matensis GCGGCAATCCCCCACCCTCGCACCCGACGCTCCATCCCGGCCCGGCC

* * ***** ** * * * * * ***** ** * * *

Artific_gene CCGGGTCGCTCCACCACCATCCAAATCCCAAGTTCTCTGGCCGCATCTA
Streptomyces matensis CCCGGCCGGTCCACCACCATCCAGATCCCAAGTTCTCCGGCCGCATCTA

** * * ***** ***** *****

artific_gene CTTCTCGTACGGGCGCAAGATGGAGTTCGACTGACTACCGGTGGCCTCG
Streptomyces matensis CTTCTCCTACGGCCGCAAGATGGAGTTCGGCTCACCACCGGCGGCCTGG

***** ***** ***** ** * * ***** ***** *

Artific_gene TGCAGCCCGCGTACAGAACCCGACTGACCCGAACCGCGACATCCTCTTC
Streptomyces matensis TGCAGCCCGCGGTGCAGAACCCACCGACCCCAACCGCGACATCCTCTTC

Artific_gene AACTGGTCCGAGTACACGCTCAACGATTCCGGGCTCTGGATCAACAGTAC
Streptomyces matensis AACTGGTCCGAGTACACGCTCAACGACTCGGGCTGTGGATCAACAGCAC

Artific_gene GCAGGTCGATATGTTCTCAGCTCCCTACACGGTGGGTGTGCGCCGCGGTG
Streptomyces matensis CCAGGTCGACATGTTCTCCGCGCCCTACACGGTGGGCGTGCGGCGCGGG

Artific_gene ACGGGACTACACTGAGTACTGGTAAACTTCGCCCTGGCGGGTACAACGGT
Streptomyces matensis ACGGCACCACACTGAGCACCAGCAAGCTGCGCCCCGGCGGCTACAACGGC

Artific_gene GTGTTCAATGCGCTCAGAGGACAGTCTGGCGGATGGGCTAACCTCATTCA
Streptomyces matensis GTGTTCAACGCCCTCAGGGACAGTCCGGCGGCTGGGCGAACCTCATCCA

Artific_gene GACGCGATCCGATGGTACCGTGCTTCGAGCGCTCTCTCCACTCTATGGTG
Streptomyces matensis GACCCGGTCCGACGGACCGTGCTGCGCGCCCTGTCCCCGCTCTACGGG

Artific_gene TCGAGACAGGTGCCCTCCCGCCTCAGTCATGGACACTACATCAACCGT
Streptomyces matensis TGGAGACCGGCGCCCTCCCGCGTCGGTCATGGACACTACATCAACCGG

Artific_gene GTCTGGAACAAGTACACAGGTACCGATCTCATAGTACCCCTTCGCCGA
Streptomyces matensis GTCTGGAACAAGTACACAGGCACGGACCTGATCGTCACGCCCTTCGCCGA

Artific_gene TCGTCTGACGTGCGCTACACTGGTCGCTCTCTGGAGGTGCTCTGCGGT
Streptomyces matensis CCGTCCCACGTCCGGTACACCGCCGGTCTCGGGCGGCGTCTGCGGT

Artific_gene TCACTGATGGGTCCGGTGCAGTCGTCACACTACATTCCAGAAGCCAGATGCC
Streptomyces matensis TCACCGACGGCTCCGGCGCCGTGGTCACCACCTTCCAGAAGCCGGACGCC
***** ** ** ***** ** ** ***** ** ***** ** **

Artific_gene TCCTCAGTATTTGGGTGCCACCGCCTCCTCGACGCCCCGAATGACCAGGT
Streptomyces matensis TCGTCCGTCTTCGGGTGCCACCGCCTCCTCGACGCGCCAACGACCAGGT
** ** ** ** ** ***** ** ** *****

Artific_gene ACGCGGACCCATCTCTCGTACGCTCTGTGCGGGCTTCAACCGTACCACC
Streptomyces matensis GCGCGGCCCATCTCGCGACCCTGTGCGGGCTTCAACCGCACCACC
***** ***** ** ** ** ***** *****

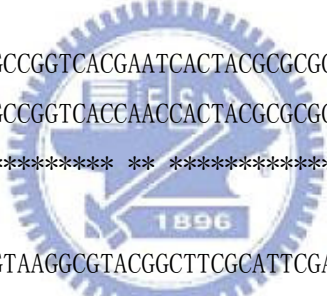
Artific_gene TGCTCGCCAACCCACATCAGCCTGACCGTAGCGCAGCGGGATTCTACCAG
Streptomyces matensis TGCTCGCCAACCCACCAGCCCGACCGGAGCGCGCGGCTTCTACCAG
***** ** ***** ***** ** ** *****

Artific_gene GAGCCGGTCACGAATCACTACGCGGGATCATAATGCACACATGGCCGA
Streptomyces matensis GAGCCGGTCACCAACCACTACGCGGGATCACCACGCGACATGGCCGA
***** ** ***** ** ** ***** **

Artific_gene_lphase CGGTAAGGCGTACGGCTTCGCATTCGACGACGTGGACATCACGAGTCTC
Streptomyces matensis CGGGAAGGCGTACGGCTTCGCCTTCGACGACGTGCGCCACCACGAGTCCG
** ***** ***** ** ** ***** *

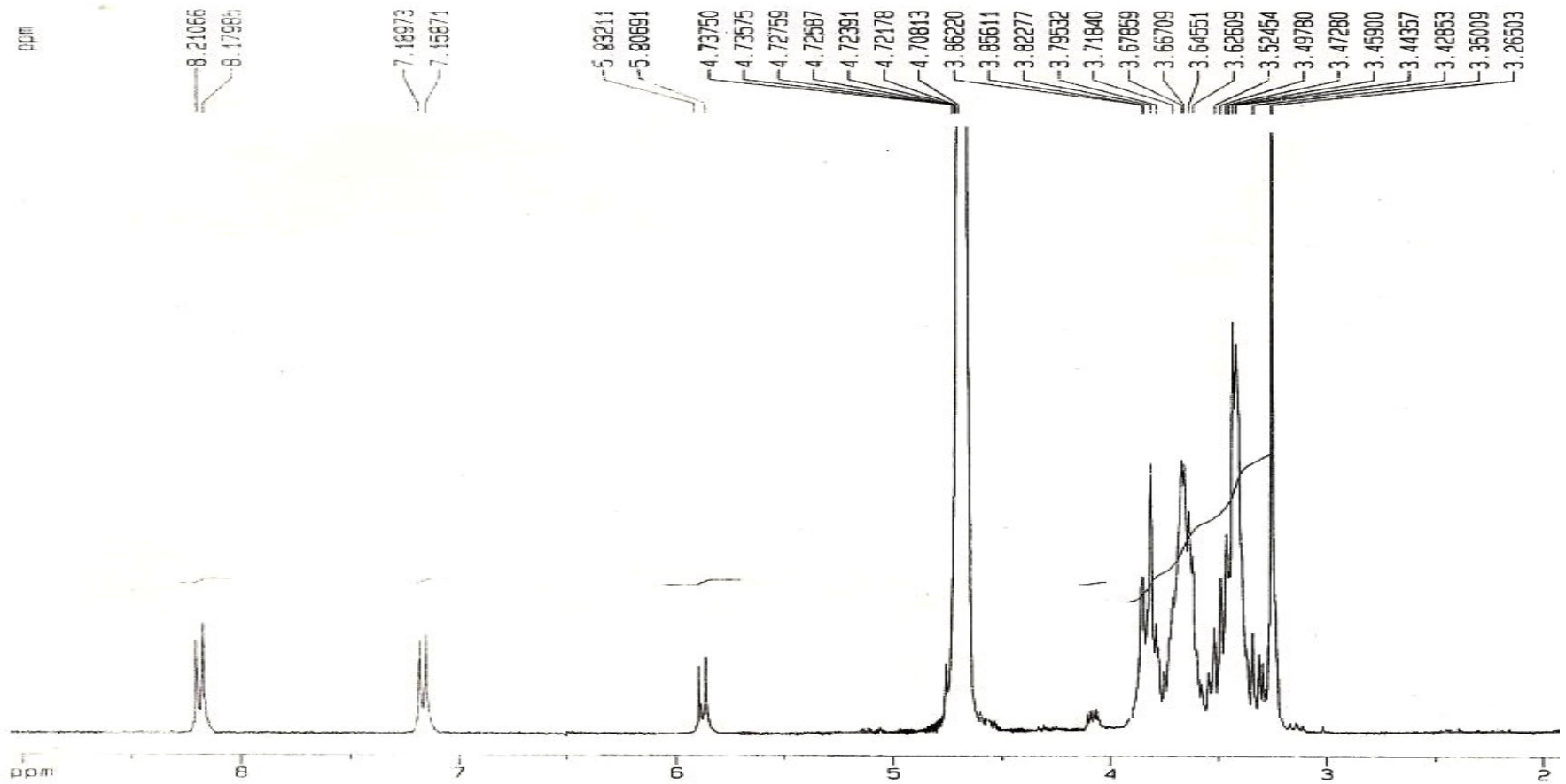
Artific_gene TGGTACATGACGGTGACCCTCGCGGTGCCTCTCTGACGCTCGACCCGTTTC
Streptomyces matensis TCGTCCACGACGGGACCCGCGGGGGTCCCTGACGCTCGACCCGTTTC
* ** ** ***** ***** ** ** *****

Artific_gene GACTGA
Streptomyces matensis GACTGA



附錄XIV-

p-nitrophenyl- β -1,3-Laminaripentaose (p-NLPG)



附錄XV-

表、野生株與突變株 β -1,3-葡聚五糖生產水解糖苷酵素對受質 *p*-NLPG 作

用之初時反應速率與相對活性比

Enzymes	Initial velocity (OD/sec)	Specific Activity (OD/sec·mg)	Relative Activity (%)
Wild-Type	0.0001194	5.40227E-05	100
D93G	0.0000951	5.0025E-05	92.6
R115K	0.0000011	3.2825E-07	0.6
R115Q	0.0000979	4.90526E-05	90.8
D143G	0.0000992	4.95929E-05	91.8
D143N	0.0000987	5.03492E-05	93.2
E154G	0.0000004	1.62068E-07	0.3
E154Q	0.0000005	2.70114E-07	0.5
E154D	0.0000175	8.53559E-06	15.8
D159G	0.0001024	5.09434E-05	94.3
D159N	0.0000939	5.02411E-05	93
D170G	0.0000008	3.78159E-07	0.7
D170N	0.0000012	5.9425E-07	1.1
D170E	0.0000825	4.34343E-05	80.4
D184G	0.0000980	5.13216E-05	95
D184N	0.0001005	5.02411E-05	93
D221G	0.0000992	4.93227E-05	91.3
D221N	0.0000924	4.97009E-05	92
D376G	0.0000903	5.01871E-05	92.9
D377G	0.0000865	4.57572E-05	84.7

* 酵素動力學分析於 50 mM 磷酸緩衝溶液，pH 7.1，40 °C，吸收波長 400 nm，與合成之糖苷受質 *p*-NLPG (5 mM)作用反應。

附錄XVI-

表 3-5. β -桶狀區域於 Dali Server 進行結構同源性比對的結果 (DALI results)

FSSP	FAMILIES OF STRUCTURALLY SIMILAR PROTEINS, VERSION 1.0 (Apr 1 1995)	
CREATED	Thu May 17 14:27:36 BST 2007 for dali on s040-028.ebi.ac.uk	
METHOD	Dali ver. 2.0: Holm, L., Sander, C. (1993) <i>J.Mol.Biol.</i> 233,123-138	
DATABASE	9005 protein chains	
PDBID	3440-X	
SEQLENGTH	184 (β -barrel domain)	
NALIGN	121	References: L. Holm and C. Sander (1996) Mapping the protein universe. <i>Science</i> 273:595-602.
WARNING	pairs with $Z < 2.0$ are structurally dissimilar	Parameters elastic similarity score, threshold 0.20; sequential alignment

SUMMARY: PDB/chain identifiers and structural alignment statistics (Top 13) (各符號的表示意義請參見附錄 7.)

NR.	STRID1	STRID2	Z	RMSD	LALI	LSEQ2	%IDE	REVERS	PERMUT	NFRAG	TOPO	PROTEIN
1	3440-X	1THV	8.8	2.8	122	207	16	0	0	11.5	SWEET TASTING PROTEIN	Thaumatococcus <i>Thaumatococcus</i> Isoform A (Orthorhombic Crystal Form)
2	3440-X	1YHP-A	5.2	3.1	93	212	10	0	0	12.5	CELL ADHESION	Calcium-dependent cell adhesion molecule
3	3440-X	1IAZ-A	5.0	3.0	100	175	8	0	0	10.5	TOXIN	Equinatoxin II (eqtII, tenebrosin C) (<i>Actinia equina</i>)
4	3440-X	1X99-A	4.5	3.3	94	141	12	0	0	11.5	SUGAR BINDING PROTEIN	Lectin (XCL lectin) Mutant_Q48M, V56M, L60M (<i>Xarocomus chrysenteron</i>)
5	3440-X	1KUM	4.1	3.6	83	108	18	0	0	10.5	HYDROLASE	Glucosylase fragment (1,4-alpha-D-glucan glucosidase)
6	3440-X	1ETB-1	4.0	3.2	84	118	12	0	0	8.5	TRANSPORT (THYROXINE)	Transthyretin (prealbumin)
7	3440-X	1B9Z-A	4.0	3.0	77	516	9	0	0	9.5	HYDROLASE	Beta-amylase (<i>Bacillus cereus</i>)
8	3440-X	1VCB-C	3.9	3.2	79	142	11	0	0	8.5	TRANSCRIPTION	Elongin B fragment / Elongin C fragment / VHL fragment
9	3440-X	1NKG-A	3.9	2.9	76	508	8	0	0	8.5	LYASE	Rhamnogalacturonase B (Rhamnogalacturonan lyase)
10	3440-X	1R6V-A	3.7	3.5	80	671	8	0	0	9.5	HYDROLASE	Subtilisin-like serine protease fragment Mutant_H208A
11	3440-X	1BDY-A	3.7	3.5	83	123	10	0	0	10.5	CALCIUM-BINDING	Protein kinase C fragment (pkc) Mutant_Gly-Ser-His at the N-terminus
12	3440-X	1CXL-A	3.5	3.2	76	686	8	0	0	9.5	GLYCOSYLTRANSFERASE	Cyclodextrin-glycosyltransferase
13	3440-X	2J71-A	3.3	3.7	78	102	8	0	0	8.5	HYDROLASE	Pullulanase (alpha-dextrin endo-1,6-alpha-glucanase)

附錄XVII-

糖苷水解酶第64號家族 (Glycoside Hydrolase Family 64 / GH-64 family) 之蛋白質序列相似度比

GenPept	Protein	Organism	Length	Identity
Bacteria				
BAA34349.1	laminaripentaose-producing β -1,3-glucanase (LPHase)	<i>Streptomyces matensis</i> DIC108	401 aa	100 %
CAC16439.1	putative secreted sugar hydrolase	<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)	398 aa	76.3 %
NP_631602.1	secreted sugar hydrolase	<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)	398 aa	76.3 %
CAJ89566.1	putative secreted sugar hydrolase	<i>Streptomyces ambofaciens</i> ATCC 23877	398 aa	75.6 %
BAC68763.1	putative sugar hydrolase	<i>Streptomyces avermitilis</i> MA-4680	399 aa	74.8 %
NP_822228.1	sugar hydrolase	<i>Streptomyces avermitilis</i> MA-4680	399 aa	74.8 %
CAC16456.1	putative secreted hydrolase	<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)	397 aa	64.3 %
NP_631619.1	secreted hydrolase	<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)	397 aa	64.3 %
BAA04892.1	β -1,3-glucanase	<i>Arthrobacter</i> sp. YCWD3	548 aa	41.5 %
AAA25520.1	β -1,3-glucanase	<i>Cellulosimicrobium cellulans</i>	548 aa	41.5 %
CAJ60367.1	putative glycosyl hydrolase	<i>Frankia alni</i> ACN14a	386 aa	38.8 %
CAB69688.1	putative glycosyl hydrolase (putative secreted protein)	<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)	400 aa	38.3 %
NP_625021.1	glycosyl hydrolase (secreted protein)	<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)	400 aa	38.3 %
CAJ88474.1	putative glycosyl hydrolase (putative secreted protein)	<i>Streptomyces ambofaciens</i> ATCC 23877	404 aa	37.4 %
BAC68677.1	putative glycosyl hydrolase	<i>Streptomyces avermitilis</i> MA-4680	402 aa	37.0 %
NP_822142.1	glycosyl hydrolase	<i>Streptomyces avermitilis</i> MA-4680	402 aa	37.0 %
CAM01376.1	glycosyl hydrolase (secreted protein)	<i>Saccharopolyspora erythraea</i> NRRL 2338	391 aa	35.1 %
AAT77161.1	glucanase B	<i>Lysobacter enzymogenes</i>	395 aa	32.9 %
ABL63814.1	β -1,3-glucanase	<i>Lysobacter enzymogenes</i>	395 aa	32.9 %
AAN77504.1	β -1,3-glucanase B	<i>Lysobacter enzymogenes</i>	395 aa	32.5 %
ABJ87314.1	hypothetical protein Acid_6388	<i>Solibacter usitatus</i> Ellin6076	424 aa	26.7 %
ABM15513.1	hypothetical protein Mvan_4739	<i>Mycobacterium vanbaalenii</i> PYR-1	791 aa	16.5 %
ABQ07184.1	Carbohydrate binding family 6	<i>Flavobacterium johnsoniae</i> UW101	884 aa	13.5 %
Eukaryota				
EAA48717.1	hypothetical protein MG00375.4	<i>Magnaporthe grisea</i> 70-15	385 aa	31.5 %
XP_368869.1	hypothetical protein MG00375.4	<i>Magnaporthe grisea</i> 70-15	385 aa	31.5 %
EAA27909.1	hypothetical protein	<i>Neurospora crassa</i>	521 aa	26.3 %
XP_326360.1	hypothetical protein	<i>Neurospora crassa</i> OR74A	521 aa	26.3 %
CAD21311.1	related to Laminaripentaose-producing β -1,3-glucanase	<i>Neurospora crassa</i>	537 aa	23.5 %
EAA32456.1	hypothetical protein	<i>Neurospora crassa</i>	537 aa	23.5 %
XP_326573.1	hypothetical protein	<i>Neurospora crassa</i> OR74A	537 aa	23.5 %

(表中編碼整理自 CAZy database : <http://www.cazy.org/fam/GH64.html>)