

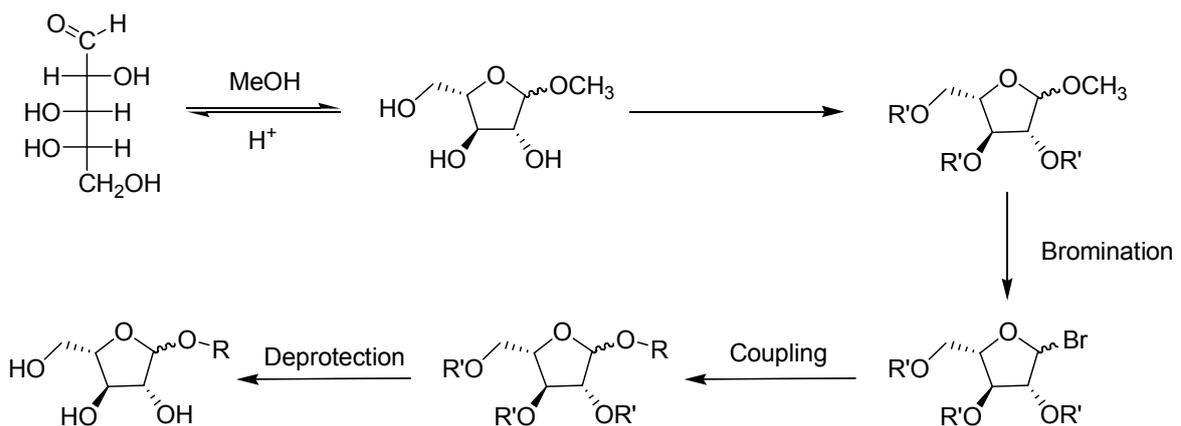
第三章 結果與討論

3-1 芳香類- α -L-阿拉伯糖苷化合物受質的合成

為了研究酵素的反應機構，我們必須使用一系列不同取代基的芳香類- α -L-阿拉伯糖苷化合物來當作受質 (substrate)，所以設計了以下幾種受質並自行合成。

- 2,5-dinitrophenyl- α -L-arabinofuranoside (DNPAF)、
- 4-chloro-2-nitrophenyl- α -L-arabinofuranoside (CNPAF)、
- 4-nitrophenyl- α -L-arabinofuranoside (PNPAF)、
- 3-nitrophenyl- α -L-arabinofuranoside (MNPAF)、
- 4-cyanophenyl- α -L-arabinofuranoside (CPAF)、
- phenyl- α -L-arabinofuranoside (PAF)。

合成策略如下：



R = 2,5-dinitrophenyl
4-chloro-2-nitrophenyl
4-nitrophenyl
3-nitrophenyl
4-cyanophenyl
phenyl

R' = Ac or Bz

圖 3-1、受質合成策略

在合成不同芳香族受質，我們採用圖 3-1 之合成策略，先由直鏈之阿拉伯糖將 C1 位置保護形成五員環，接著保護其他 OH group，然後溴化再進行耦合(coupling)，最後去保護基。

首先遇到的問題為五員環光譜之確認，由直鏈環成五員環的反應中同時也會得到六員環之產物，且兩產物之極性非常相近，我們嘗試以管柱層析分離純化可是效果不佳，因此造成光譜上判定的困擾，所幸在進行 Benzoylation 保護 OH group 後可用再結晶方式得到一白色固體，初步的光譜分析可得知為單一化合物，剩餘的黏稠狀液體進一步再以管柱層析可分離出兩區域之化合物(以 TLC 判斷)，其中一區域之化合物經過初步的光譜分析可知為單一化合物，另一區域為混合物。

藉由文獻記載之光譜^(17, 18, 19)可判別其五員環之光譜，幸運的上述兩單一化合物均為五員環，其總產率約為 69%。此外，所得到之五員環 NMR 光譜 C1-H 位置上 α -form (trans) 取代基在光譜中分裂 (split) 通常不明顯，這與一般六員環醣類之情形迥異，造成辨別立體結構上很大的困擾，藉由文獻^(18, 20)提到在 methyl- α -L-xylofuranoside 以及 α -L-arabinofuranoside 衍生物合成中醣類 C1-H coupling constant α -form 化合物通常約為 1Hz，有時甚至更小，因此可判定哪一化合物為五員環 α -form 或 β -form。

在保護基的選擇上，是依據所要接上去芳香族 pK_a 不同而作改變， pK_a 小於 6 之 2,5-dinitrophenyl group 衍生物我們選用 OAc 當作 OH group 保護基，其考量原因為在鹼性條件下進行去保護反應， pK_a 較小之芳香族衍生物很不穩定，所接上去之芳香族很容易解離，而得不到所預期的產物，因此選用可在酸性條件下去保護的 OAc 保護基⁽¹⁶⁾。

耦合(coupling)反應採用兩種條件去進行，也是依據 pK_a 不同而選擇， pK_a 大於 8 之芳香族先與 KOH 形成 phenolate 再進行耦和，而 pK_a 小於 8 之芳香族則使用 DIPAE 有機鹼和 phenol 直接進行反應。

相同的，在 coupling 後五員環光譜中 C1-H coupling constant 也沒有出現，我們還是不禁懷疑所合成之化合物其位向是否正確，所幸得到 2,3,5-tri-O-benzoyl-2,4-dinitro-phenyl- α -L-arabinofuranoside 的結晶並取得

X-ray 繞射圖譜(附錄一)，證實所合成之化合物其位向是符合我們所預期，並依此光譜作為之後其他化合物光譜之比對。

而去保護除 TADNPAF 外，均以鹼性條件 MeOH / K₂CO₃ 進行去保護，(pK_a ≥ 7 亦可選擇用 MeOH / NaOCH₃)，而 TADNPAF 則使用含有 3% HCl 的甲醇 (密閉容器下，無水 MeOH 打入 acetylchloride)，並在適當的之時間終止反應，純化分離出產物。

所得到之最終產物，除了 C1-H coupling constant 符合文獻所記載約為 1Hz (α -form)外，酵素與受質可進行水解反應，由此亦可知其產物為 α -L-arabinofuranoside 之衍生物。

表 3、受質合成反應條件

芳香族取代基	pK _a	前驅物保護基	去保護條件	去保護產率(%)
Phenyl	9.99	OBz	MeOH / K ₂ CO ₃ *	94
4-cyano-phenyl	8.49	OBz	MeOH / K ₂ CO ₃ *	93
3-nitro-phenyl	8.39	OBz	MeOH / K ₂ CO ₃ *	83
4-nitro-phenyl	7.18	OBz	MeOH / K ₂ CO ₃	88
4-chloro-2-nitro-phenyl	6.45	OBz	MeOH / K ₂ CO ₃	80
2,5-dinitro-phenyl	5.15	OAc	3% HCl in MeOH	46

* 去保護條件亦可用 MeOH / NaOCH₃ (cat.)

化合物之結構式參閱附錄二

化合物之 NMR 光譜參閱附錄三

化合物 1a α -1-methyl-*L*-arabinofuranoside (MAF) : 4.81(d,1H,J=1.53Hz)
3.92(m,1H) 3.83(m,1H) 3.70(dd,1H,J=3.36,8.89Hz)
3.58(dd,1H,J=5.79,6.51Hz) 3.30(s,3H)

化合物 2a α -1-methyl-2,3,5-tri-*O*-benzoyl-*L*-arabinofuranoside
(MTBAF) : 8.08-7.97(m,6H) 7.58-7.28(m,9H) 5.58(d,1H,J=5Hz) 5.50(s,1H)
5.17(s,1H) 4.83(dd,1H,J=3.29,8.24) 4.67(dd,1H,J=4.66,7.14Hz) 4.56(m,1H)

化合物 3a α -1-methyl-2,3,5-tri-*O*-acetyl-*L*-arabinofuranoside (MTAAF) :
5.05(d,1H,J=1.65Hz) 4.97(d,1H,J=4.67Hz) 4.91(s,1H)
4.43(dd,1H,J=5.49,8.51Hz) 4.22(m,2H) 3.39(s,3H) 2.08(s,9H)

化合物 4a 2,3,5-tri-*O*-acetyl-2,5-dinitrophenyl- α -*L*-arabinofuranoside
(TADNPAF) : 8.16(d,1H,J=2.2Hz) 7.99(dd,1H,J=2.47,8.51Hz)
7.90(d,1H,J=8.33Hz) 5.94(s,1H) 5.36(s,1H) 5.07(d,1H,J=3.02Hz)
4.38(d,1H,J=3.02Hz) 4.36(d,1H,J=4.12) 4.27(dd,1H,J=5.77,6.03Hz)

化合物 5a 2,3,5-tri-*O*-benzoyl-4-chloro-2-nitrophenyl- α -*L*-arabinofuranoside
(TBCNPAF) : 8.15-7.24(m,18H) 6.03(s,1H) 5.80(s,1H) 5.70(d,1H,J=4.1Hz)
4.83(dd,1H,J=3.15,3.13Hz) 4.78-4.69(m,2H)

化合物 6a 2,3,5-tri-*O*-benzoyl-4-nitrophenyl- α -*L*-arabinofuranoside
(TBpNPAF) : 8.22-7.19(m,19H) 6.05(s,1H) 5.81(s,1H) 5.70(d,1H,J=3.84Hz)
4.83(dd,1H,J=5.49,7.96Hz) 4.73(m,2H)

化合物 7a 2,3,5-tri-*O*-benzoyl-*m*-nitrophenyl- α -*L*-arabinofuranoside

(TBmNPAF) : 8.11-7.29(m,19H) 6.03(s,1H) 5.80(s,1H) 5.71(d,1H,J=3.72Hz)
4.81(dd,1H,J=2.96,4.9Hz) 4.73(m,2H)

化合物 8a 2,3,5-tri-*O*-benzoyl-4-cyanophenyl- α -*L*-arabinofuranoside
(TBpCNPAF) : 8.09(m,19H) 5.99(s,1H) 5.79(d,1H,J=6.44Hz)
5.67(dd,1H,J=3.91,8.31Hz) 4.82(dd,1H,J=2.43,5.99Hz) 4.71(m,2H)

化合物 9a 2,3,5-tri-*O*-benzoyl-phenyl- α -*L*-arabinofuranoside
(TBPAF) : 8.12-7.00(m,20H) 5.96(s,1H) 5.78(d,1H,J=0.96Hz)
5.68(d,1H,J=3.27Hz) 4.81-4.68(m,3H)

化合物 1b β -1-methyl-2,3,5-tri-*O*-benzoyl-*L*-arabinofuranoside
(MTBAF) : 4.78(d,1H,J=4.58Hz) 4.02(dd,1H,J=3.31,4.58Hz) 3.89(t,1H)
3.77(m,1H) 3.65(dd,1H,J=3.28,8.75Hz) 3.50(dd,1H,J=5.22,7.00Hz)

化合物 2b β -1-methyl-2,3,5-tri-*O*-benzoyl-*L*-arabinofuranoside
(MTBAF) : 5.96(dd,1H,J=5.49,1.37Hz) 5.48(dd,1H,J=2.47,4.66Hz)
5.34(d,1H,J=4.66Hz) 4.75(dd,1H,J=4.39,7.41Hz) 4.61(dd,1H,J=4.93,6.87Hz)
4.47(m,1H) 3.36(s,3H)

化合物 3b β -1-methyl-2,3,5-tri-*O*-acetyl-*L*-arabinofuranoside (MTAAF) :
5.032(d,1H,J=1.56) 4.95(dd,1H,J=1.11,3.39Hz) 4.89(s,1H) 4.40(m,1H)
4.19(m,2H) 3.37(s,3H) 2.18(s,3H) 2.07(s,6H)

化合物 4b 2,5-dinitrophenyl- α -*L*-arabinofuranoside (DNPAF) : 8.27(s,1H)
8.01(d,2H,J=1.1Hz) 5.78(d,1H,J=1.37Hz) 4.32(dd,1H,J=1.37,2.47Hz)
4.09(m,1H) 4.02(dd,1H,J=2.74,3.84Hz) 3.79(dd,1H,J=3.02,9.05Hz)
3.68(dd,1H,4.66,7.41Hz)

化合物 5b 4-Chloro-2-nitro-phenyl- α -*L*-arabinofuranoside (CNPAF) :

7.92(d,1H,J=2.74Hz) 7.58(dd,1H,J=2.74,6.32Hz) 7.32(d,1H,J=9.06Hz)
5.66(d,1H,J=1.37Hz) 4.34(dd,1H,J=1.65,1.92Hz) 4.12(m,1H)
3.98(dd,1H,J=2.47,3.57Hz) 3.73(dd,1H,J=3.57,9.05Hz)
3.63(dd,1H,J=5.49,6.86Hz)

化合物 6b p-nitrophenyl- α -L-arabiofuranoside (pNPAF) :

8.28(d,2H,J=9.34Hz) 7.26(d,2H,J=9.06Hz) 5.88(d,1H,J=1.1Hz)
4.46(dd,1H,J=1.37,1.67Hz) 4.20(dd,1H,J=2.74,3.33Hz)
4.14(dd,1H,J=3.57,9.06Hz) 3.77(dd,1H,J=5.67,7.14Hz)

化合物 7b m-nitrophenyl- α -L-arabiofuranoside (mNPAF) :

7.8(d,2H,J=8.78Hz) 7.48-7.37(m,2H) 5.68(s,1H) 4.29(dd,1H,J=1.54,1.67Hz)
4.07(m,1H) 3.99(m,1H) 3.72(m,1H) 3.63(m,1H)

化合物 8b p-cyanophenyl- α -L-arabiofuranoside (pCNPAF) :

7.65(d,2H,J=8.91Hz) 7.12(d,2H,J=8.89Hz) 5.71(s,1H)
4.30(dd,1H,J=1.53,1.55Hz) 4.07(dd,1H,J=2.00,3.38Hz)
4.00(dd,1H,J=2.53,3.26Hz) 3.73(dd,1H,J=3.42,9.05Hz)
3.64(dd,1H,J=5.38,6.94Hz)

化合物 9b Phenyl- α -L-arabiofuranoside (PAF) : 7.33(t,2H) 7.05(m,3H)

5.64(s,1H) 4.29(m,1H) 4.11(dd,1H,J=3.57,5.49Hz)
4.02(dd,1H,J=2.19,3.56Hz) 3.75(dd,1H,J=3.57,8.78Hz)
3.66(dd,1H,J=5.49,11.25Hz)

3-2 α -L-arabinofuranosidase 的純化

3-2-1 α -L-arabinofuranosidase (ABF)之純化

在酵素純化之實驗中，我們利用本實驗室已建立好的純化方式進行純化，使用 SP column 以 NaCl 梯度由 0 mM 到 1000 mM，流速為 0.67 mL / min 的條件下進行純化；由蛋白質電泳 SDS-PAGE 分析結果得知有很好的分離效果，其純度約達 90 % 以上。其層析條件及結果如下圖所示。

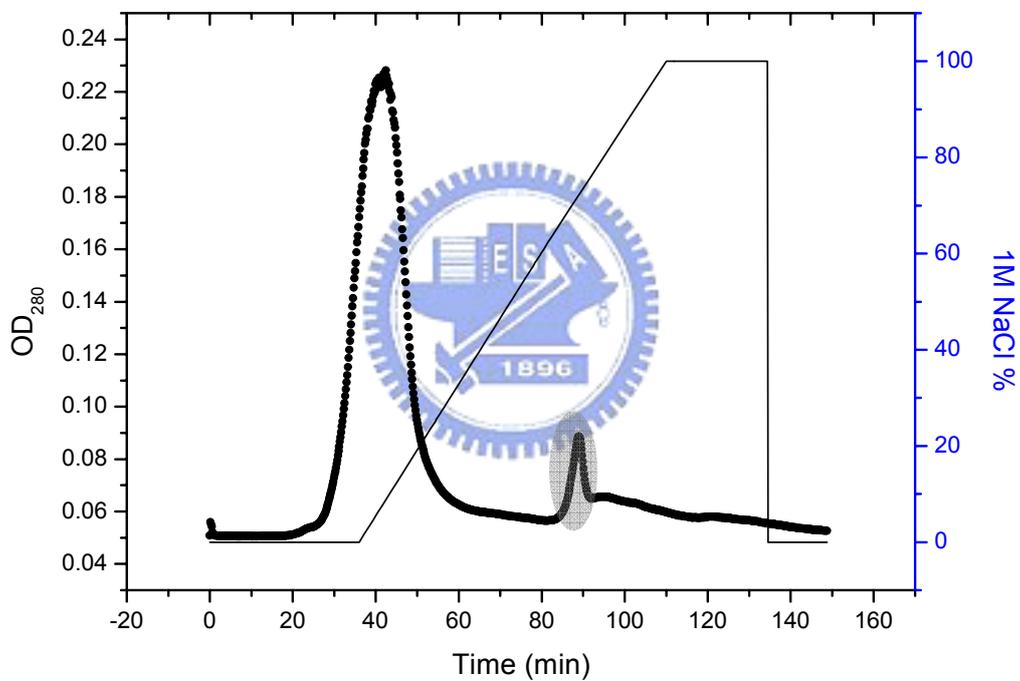


圖 3-2、 α -L-arabinofuranosidase (ABF) 經 SP 陽離子交換樹脂管柱層析圖

• : OD₂₈₀ -- : 1M NaCl %

3-2-2 α -L-arabinofuranosidase (ABF) 純度及分子量

蛋白質分子量的決定以 SDS-PAGE 決定之，SP 陽離子交換樹脂層析過後之蛋白質膠體電泳如下圖，由 SDS-PAGE 之分析可估計酵素之分子量約 50 KDa。

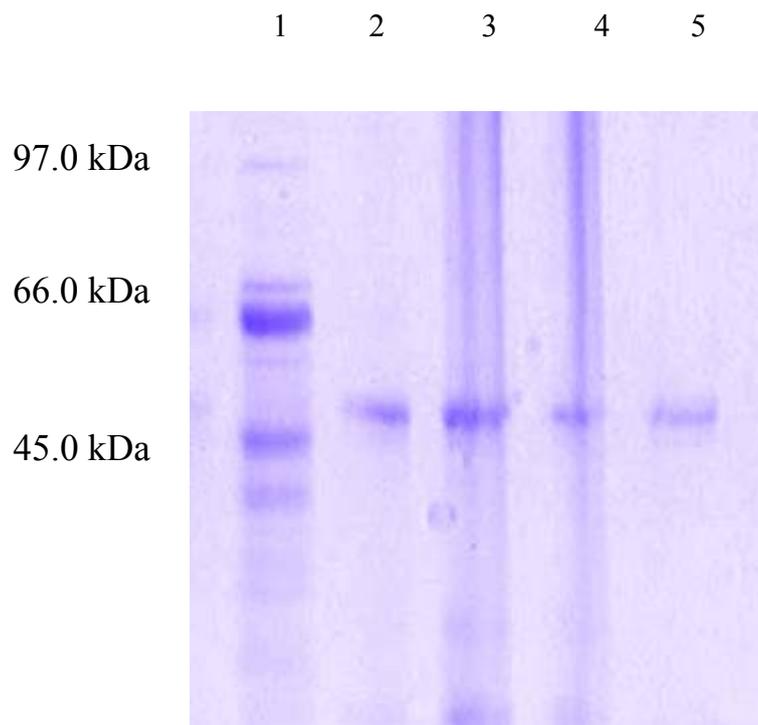


圖 3-3、 α -L-arabinofuranosidase (ABF)純化之 SDS-PAGE 分析圖

Lane 1 : Protein Marker

Lane 2 3 4 5 : 經 SP column 純化之酵素

3-3 酵素反應機制之研究

3-3-1 酸鹼度對酵素活性之影響

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 HCl / KCl (100 mM , pH 1.7) 、 Na₂HPO₄ (100 mM , pH 3.1) 、 NaOAc (100 mM , pH 3.8 、 4.5 、 5.0 、 5.5) 、 Na₂HPO₄ (100 mM , pH 6.0 、 6.9 、 8.1) 、 Tris-base (100 mM , pH 8.9) ；所使用的受質為 pNPAF，反應時間在 5 分鐘內完成，將反應初始速率對酸鹼值作圖，即可得知酸鹼值對酵素活性的影響⁽¹¹⁾。

對於糖苷水解酵素(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 pK_a (apparent pK_a) 操控，在許多酵素的研究中，此兩個 pK_a 反應出兩個胺基酸殘基在催化過程中扮演重要角色(各為 4.3 及 6.0)。圖 3-4 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 4.5~6.0 其酵素有較強之活性且兩個 pK_a 各為 4.3 及 6.0，由此推論具有催化活性的酵素為單一解離態 (mono deprotonated form)。



文獻中報導此 α -L-arabinofuranosidase (ABF) 酵素具有轉糖反應，本實驗室也曾利用質譜得到其轉糖之證據⁽¹¹⁾，為了進一步了解其酵素之催化反應機構，我們利用其轉糖之特性做了接下來的實驗。

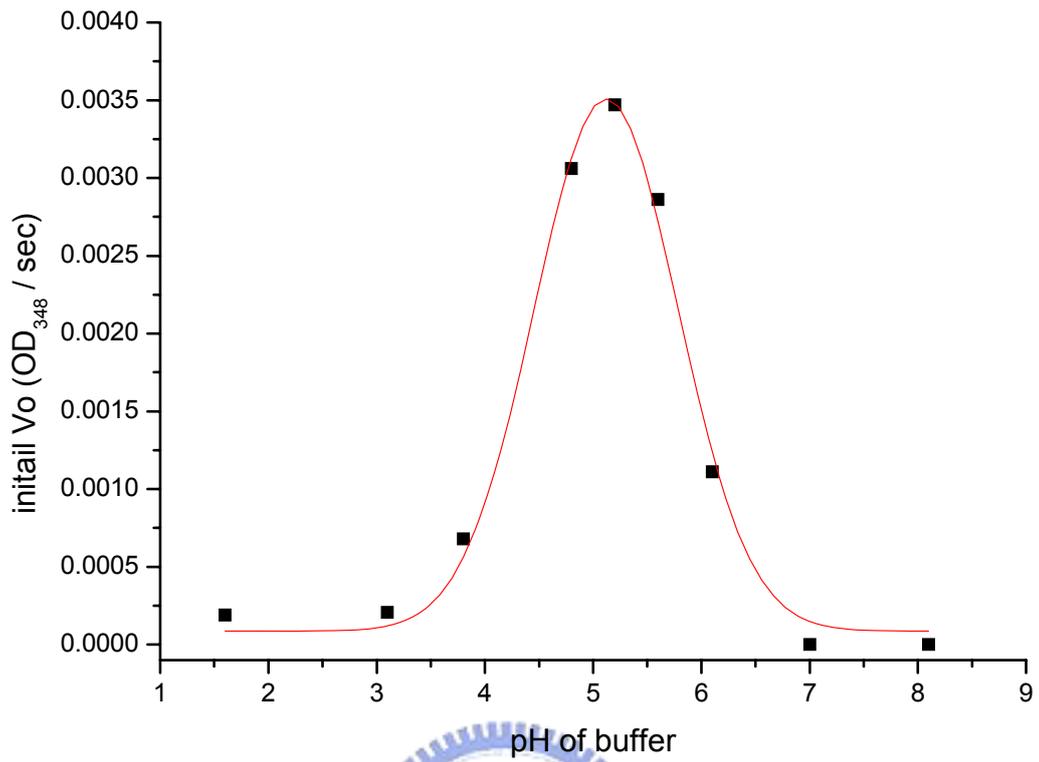


圖 3-4、酸鹼值對 arabinofuranosidase 酵素活性之影響

(PNPFAF 受質 [S]= 0.1 mM, [E]=0.0299 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, T=25 $^{\circ}\text{C}$
 pK_a 4.3、6.0)

3-3-2 共同反應中間體 (Common intermediate)

由上一節之 pH profile 我們可知酵素催化過程中可能有兩個重要胺基酸參與反應，為進一步分析酵素之催化反應機制為 Inverting 或 retaining，我們假設此反應機構為 two-step 之型態，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，經由控制一定濃度之甲醇 (5M) 來觀測其產物及其比例。

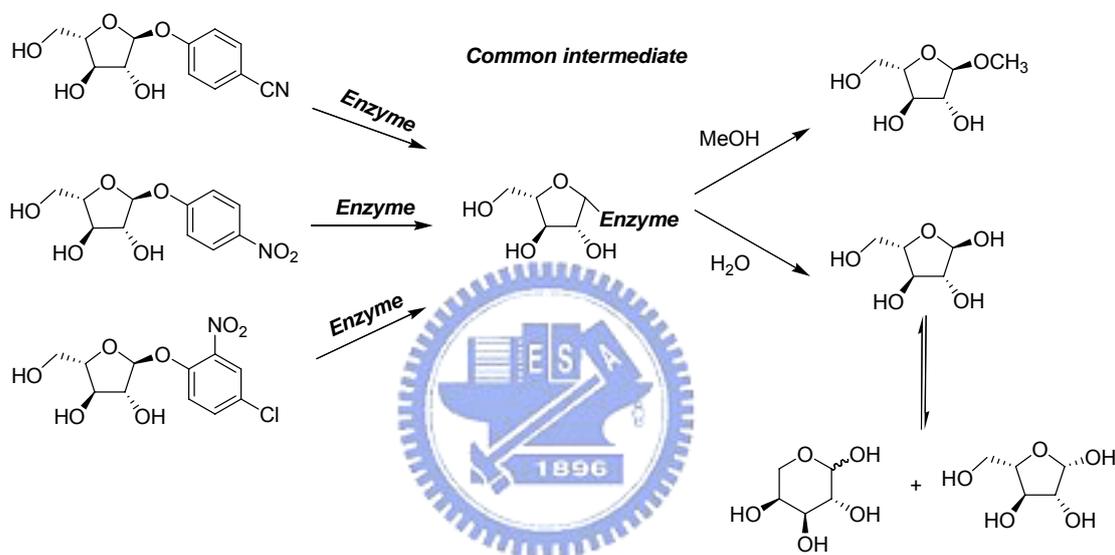


圖 3-5、經由共同反應中間體之推測反應途徑

反應在 pH 4.5 進行觀測各試管均由無色澄清溶液變成淡黃色溶液，將產物分別乾燥及收集，經由 NMR 測量結果，起始物 substrates 完全被水解，而殘餘物的 NMR 圖譜非常類似預估之產物有 α -MAF、 α -Arabinofuranoside、 β -Arabinofuranoside、 α -Arabinopyranoside 以及 β -Arabinopyranoside (圖 3-6)；進一步比對 NMR 圖譜，發現其各訊號之積分值非常接近，但是 MAF 的 C1-H 會有部分重疊在所使用的溶劑訊號裡造成我們在積分時的不準確，因此調整 NMR chamber 的溫度使訊號移動，最後選用 30 °C，此一溫度下可以使 MAF 上 C1-H 移動到 5.02 ppm 因而不會與 solvent (DHO, 4.72ppm) 訊號有重疊。(NMR 圖譜為附錄四)

在 30 °C NMR 的光譜中，我們定 5.04 ppm 之訊號積分值為 1，此訊號為 α -MAF 之 C1-H 之訊號，其餘之重要訊號為⁽¹⁷⁻²¹⁾: α -Arabinofuranoside C1-H、 β -Arabinofuranoside C1-H、 α -Arabinopyranoside C1-H 以及 β -Arabinopyranoside C1-H (與附錄五 NMR 光譜比對)，其積分值如表 4。

在 25°C NMR 數據： α -MAF C1-H 4.86 ppm J=1.03 Hz、
 α -Araf C1-H 5.17 ppm、
 β -Arap C1-H 5.16 ppm J=3.24 Hz、
 β -Araf C1-H 5.22 ppm J=3.8 Hz、
 α -Arap C1-H 4.43 ppm J=5.89 Hz。

30°C NMR 數據： α -MAF C1-H 5.04 ppm、
 α -Araf C1-H 5.36 ppm、
 β -Arap C1-H 5.34 ppm、
 β -Araf C1-H 5.42 ppm、
 α -Arap C1-H 4.63 ppm。

表 4、轉醣反應之重要胺基酸 NMR 積分訊號

	α -MAF C1-H	α -Araf C1-H	β -Arap C1-H	β -Araf C1-H	α -Arap C1-H	Ratio*
CPAF	1	0.366		0.0039	0.675	1.0449
PNPAF	1	0.364		0.0046	0.696	1.0646
CNPAF	1	0.359		0.0039	0.665	1.0279

* Ratio 是將 α -Arabinofuranoside C1-H、 β -Arabinofuranoside C1-H、 α -Arabinopyranoside C1-H 以及 β -Arabinopyranoside C1-H 之積分訊號相加後除以 α -MAFC1-H 之積分訊號

由表 3 數據可知其反應之產物比例相同，並由 NMR 圖譜 (附錄四) 得知，此酵素有轉醣的反應，並為構型保留型之催化特性 (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)，間接的證明此催化反應為 two-step 的催化反應機制。

此類水解酵素通常以圖 3-7 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，首先為酵素糖基化(Glycosylation)形成一糖基-酵素中間體，第二步驟則由水或其他親核劑，如醇類，對糖基-酵素中間體進行親核反應除去酵素上之糖基，此步驟稱為去糖基化(deglycosilation)。催化的過程中會涉及至少兩個重要之胺基酸殘基，其功用各為親核基(低 pK_a 者)，另一則為 general acid / base 基(高 pK_a 者)。

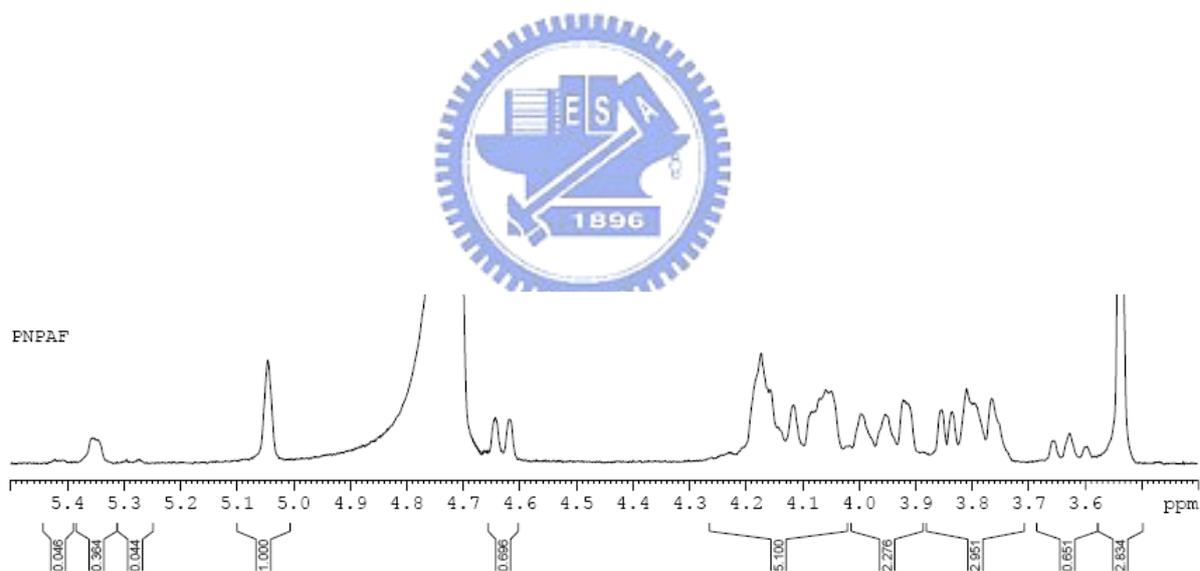


圖 3-6、30°C 產物 NMR 光譜圖

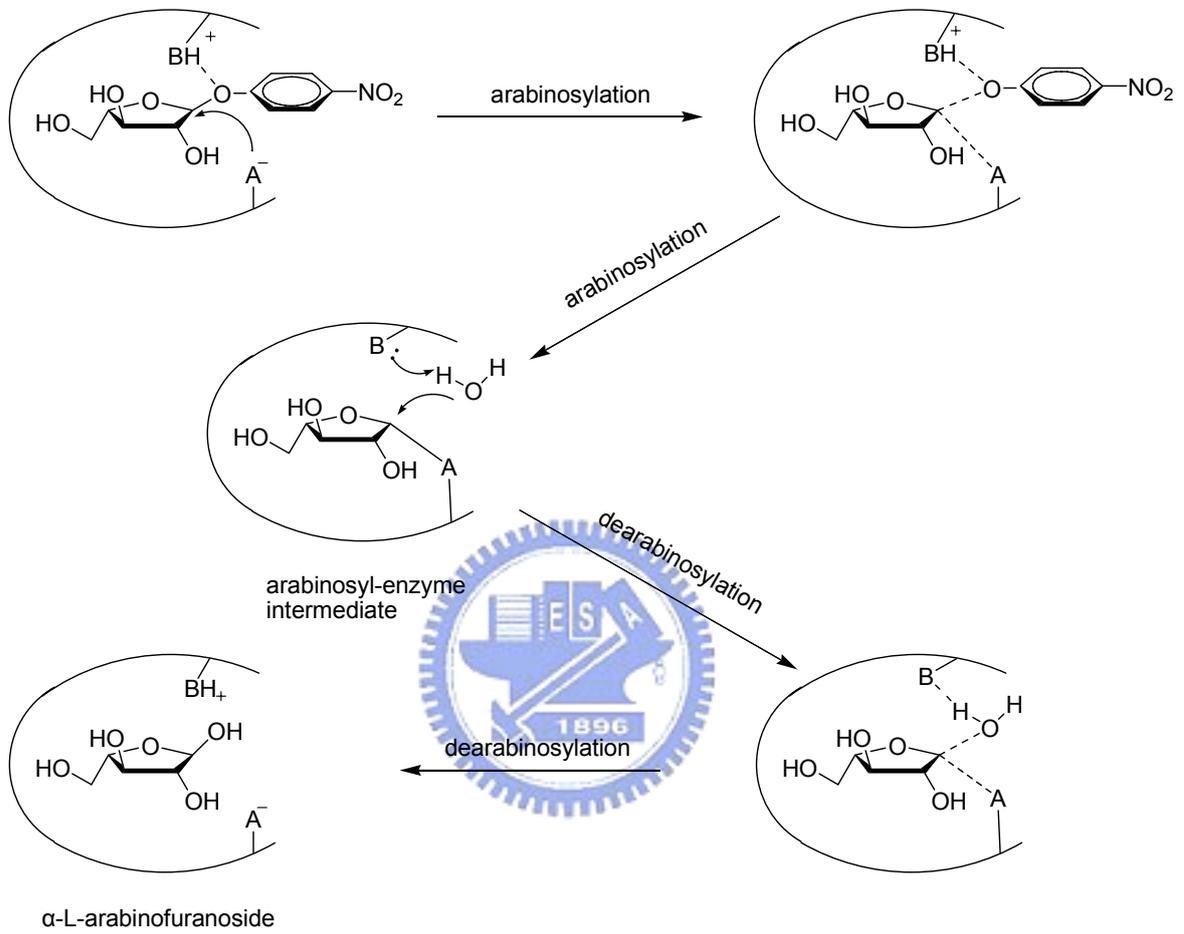


圖 3-7 、 α -L-arabinofuranosidase 推測的反應機制及其過渡態之結構

3-3-3 催化速率決定步驟之探討

經由前面的實驗結果可知此酵素催化機制應為兩步驟，為了探討哪一個步驟是速率決定步驟，我們分析不同 aryl- α -L-arabinofuranoside 受質與 α -L-arabinofuranosidase (ABF) 之反應，所產生的動力學數據，以雙倒數作圖法分析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} (表 5)，並將 $\log k_{cat}$ 、 $\log k_{cat}/K_m$ 以及 $\log K_m$ 對不同離去基之 pK_a 作圖 (圖 3-8、3-9、3-10)。

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，在構型保留的醣類水解酵素中，非醣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之影響。 k_{cat} 是與速率決定步驟有關，由圖 3-8 可以看出 $\log k_{cat}$ 對不同芳香族 pK_a 作圖，所得到之線性變化為單一關係，雖然此 Brønsted plot 並不能明確地得知其反應機制為 two-step 反應機制，但由 $\log k_{cat}$ 值與芳香族離去基 pK_a 值呈緩慢線性下降其斜率 (β_{lg}) 約為 -0.19 (與突變株 D299G 相比數值很小)，可知芳香族離去基之強弱對整個催化反應影響不大，我們推論反應速率決定步驟 (rate-limiting step) 為 dearabinosylation step，而 arabinosylation step 是快速反應步驟。從另一方面來看，若反應之速率決定步驟為 arabinosylation step 而其 β_{lg} 約為 -0.19 則可推測其過渡狀態中只有少部分之電子轉移到離去基之氧原子上，表示醣基與離去基鍵結之 C-O 鍵只有少許之斷裂，表示其過渡狀態為 early-transition state，其反應物過渡態應與起始反應物應相當相似，所以使用 MAF 當作抑制劑應該會有很好的抑制效果，不過先前的研究發現⁽¹¹⁾以 MAF 當成此酵素之抑制劑，同時與 pNPAF 及酵素反應，得到 $K_i \sim 16$ mM，其抑制之能力並不明顯，這與上述之推論 (速率決定步驟為 arabinosylation step) 並不符合，由此我們推測其反應速率決定步驟應為 dearabinosylation step 而非 arabinosylation step。而 k_{cat}/K_m 之數值是與水解反應中第一個不可逆的步驟有關，所以

此一數值與芳香族離去基 pK_a 之關係則可以提供 arabinosylation step 的資訊，由圖 3-9 顯示與圖 3-8 可得 β_{lg} 約為 -0.18，顯示在 wild-type ABF 催化反應中離去基之強弱並未敏銳的在 arabinosylation step 中呈現出來。

如前所述，其反應之 pH-profile 為鐘型曲線之型態分別反應出兩個 pK_a 值，以醣類水解酵素而言，此兩重要殘基為具有羧酸基者如 Asp 和 Glu，鮮少例外，因此尋找此酵素之重要殘基的方法之一為將諸多同家族之酵素的胺基酸並列進行比對，找出保留區之 Asp 或 Glu 所在。為鑑定此 ABF 之主要胺基酸位置，我們針對了家族 54 之酵素進行比對⁽¹¹⁾，共有超過二十七個以上的 Asp 或 Glu 出現於保留區內，本實驗室 萬金鳳學姊將其保留區的酵素分別進行定點突變，並依其殘餘活性篩選出重要胺基酸殘基 (表 6)，其重要胺基酸殘基有 D299、E223 等。

在 2004 年 Akimasa Miyanaga *et al*⁽²²⁾ 得到此家族之酵素結晶並指出其酵素重要胺基酸為 D297 (general acid / base)、E221 (nucleophile)，藉由比對酵素胺基酸序列推測我們酵素之重要胺基酸為 D299 (general acid / base)、E223 (nucleophile)，並將酵素分別進行此兩胺基酸突變之，作酸鹼值對酵素活性之影響，實驗條件與野生株重組酵素相同。圖 3-11，在突變 D299G 酵素 (General acid / base) 之 pH-profile 亦呈現近似鐘型曲線的特性，惟其顯現出的兩 pK_a 約為 4.3 和 7.5， pK_a 4.3 顯示親核基仍然存在而 pK_a 7.5 已與野生株 ABF ($pK_a = 6.0$) 不同，顯示 D299 遭移除後，可能有另一殘基存在於 D299 附近，遞補 D299 之催化角色。至於 E223Q 則因活性嚴重喪失而無法明顯測定其 pH-profile，如圖 3-12 所示。

此外，我們探討了突變株 D299G 酵素之動力學參數所產生的動力學數據，以雙倒數作圖法分析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} (表 7)，並將 $\log k_{cat}$ 、 $\log k_{cat} / K_m$ 以及 $\log K_m$ 對不同離去基之 pK_a 作圖並與 wild type 之數據比較之。突變株酵素 (D299G) 之動力學分析中可看到其 k_{cat} 對不同芳香族 pK_a 作圖中 (圖 3-8)，在 pK_a 為 5.15 之 k_{cat} 數據中沒有與其餘芳香族離去基 pK_a 點呈線性之關係，在 k_{cat} / K_m 對不同芳香族 pK_a 作圖亦相同 (圖 3-9)，我們推測其突變株反應機構已經

改變。芳香族離去基之 pK_a 小於 6 之受質 (好的芳香族離去基) 在水解的過程中 general acid / base 的重要性相對較小，其速率決定步驟為 dearabinosylation step，快速反應步驟為 arabinosylation step；而酵素與離去基之 pK_a 大於 6 之受質因斜率 (β_{lg}) 約為 -1.33 表示水解催化反應與芳香族離去基有相當大的關係故反應其速率決定步驟為 arabinosylation step，快速反應步驟為 dearabinosylation step，由此突變株酵素之 Brønsted plot 可知突變 D299G 會改變反應之反應機構，表示 D299 在此酵素水解反應中扮演重要之角色，並由斜率 $\beta_{lg} = -1.33$ 得知在過渡狀態中有大量電子轉移至離去基之氧原子上，表示糖基與離去基鍵結之 C-O 鍵已有大部分斷裂，其反應物過渡狀態是 oxocarbenium，然而 arabinosyl-enzyme 中間體則無法判定，進一步的研究有賴 α -二級同位素效應 (α -secondary kinetic isotope effect) 的研究解析。

在 wild type 酵素與 D299G 酵素之 k_{cat} / K_m 方面，wild type 酵素之 k_{cat} / K_m 之數值變化很小，而 D299G 酵素之 k_{cat} / K_m 比較得知其變化很大， $\beta_{lg} = -1.26$ ，我們推測這現象為是缺乏 general acid / base 後所造成之效應，好的 leaving group 會加快第一步驟，而因為較不需要 general acid / base 胺基酸殘基來增強水之親核性，而較差的 leaving group 則強烈的需要有 general acid / base 胺基酸殘基來幫助水解，因此造成反應機構之改變，在此情況下第二步驟為速率決定步驟，也因此應可見到 glycosyl-enzyme 中間體的累積，且此累積現象可表現在 K_m 值之變化因 $K_m = [E][S] / \sum[E-S]$ ，實驗顯示反應基質(離去基 < 6.45)之 K_m 值 (~0.1mM) 約小於野生株 3 倍左右；理論上我們應該可以看到 E (D299G)-S 之 intermediate，但經由 LC / MS 的分析並未偵測到 E (D299G)-S intermediate 之存在，進一步探討 D299G 酵素之 k_{cat} 值 (0.69 sec^{-1}) 得知其 E-S 的 half life 僅約為 1 秒，存在之時間太短，當我們處理完樣品再打入 LC / MS 後其中間過渡態(E-S)均分解為產物了。除了 D299G 以外我們也利用 D299Q 突變酵素 (反應性較差) 作以上之實驗以期望可以偵測到 E-S intermediate，還未得到明顯之結果。

此外為了證實我們之 E223 為重要胺基酸 (nucleophile)，我們在 E223G 突變株酵素裡添加外來化學試劑 (分別為 Sodium azide 0.5M-3M 以及 MeOH 0.5M-2M) 並未得到活性的挽救 (chemically rescue)，這與 2004 年 Akimasa Miyana *et al*⁽²²⁾ 所作之結果相同，此參考文獻亦指出因為家族 54 之 α -L-arabinofuranosidase 其反應之活性點在酵素反應活性區內的較深處，所以可能造成 azide ion 無法深入到胺基酸 E223 被突變 (E223G) 後所空出來之空間來替代酵素重要胺基酸 (nucleophile)，然而突變酵素之活性和 X-ray 結構已可相互印證 E223 在催化作用上扮演著親核基之角色。



表 5、 k_{cat} 、 K_m 以及 Brønsted plot 數據

	pK_a	K_m	k_{cat} (S^{-1})	k_{cat}/K_m ($M^{-1}S^{-1}$)	Log k_{cat}	$\log(k_{cat}/K_m)$	$\log K_m$
2,5-di-NO ₂	5.15	0.28	8.25	29542	0.916496	4.47	-0.55284
4-Cl-2NO ₂	6.45	0.42	6.52	15633	0.814394	4.19	-0.37675
4-NO ₂	7.18	0.31	2.84	9215	0.453318	3.96	-0.50864
3-NO ₂	8.39	0.54	2.02	7369	0.30591	3.87	-0.26761
4-CN	8.49	0.30	1.706	5593	0.229835	3.75	-0.52288
Ph	9.99	0.28	1.23	4335	0.089234	3.64	-0.55284

表 6、突變株酵素酵素活性

Enzyme	Relative activity (%)
ABF(WT)	100
D299N	< 1
E223Q	~0

(pH 6.4, 100mM MES, 0.5mM PNPAF, AU₄₀₀)

(此表由萬金鳳學姊提供)

表 7、突變株 D299G k_{cat} 、 K_m 以及 Brønsted plot 數據

	pK_a	K_m	k_{cat} (S^{-1})	k_{cat}/K_m ($M^{-1}S^{-1}$)	$\log k_{cat}$	$\log(k_{cat}/K_m)$	$\log K_m$
2,5-di-NO ₂	5.15	0.102	0.69	6761	-0.159	3.83	-0.989
4-Cl-2NO ₂	6.45	0.090	0.12	1270	-0.941	3.10	-1.045
4-NO ₂	7.18	0.091	0.0137	150	-1.863	2.18	-1.040
3-NO ₂	8.39	0.650	0.00030	0.469	-3.516	-0.329	-0.187
4-CN	8.49	0.691	0.00038	0.558	-3.413	-0.254	-0.160

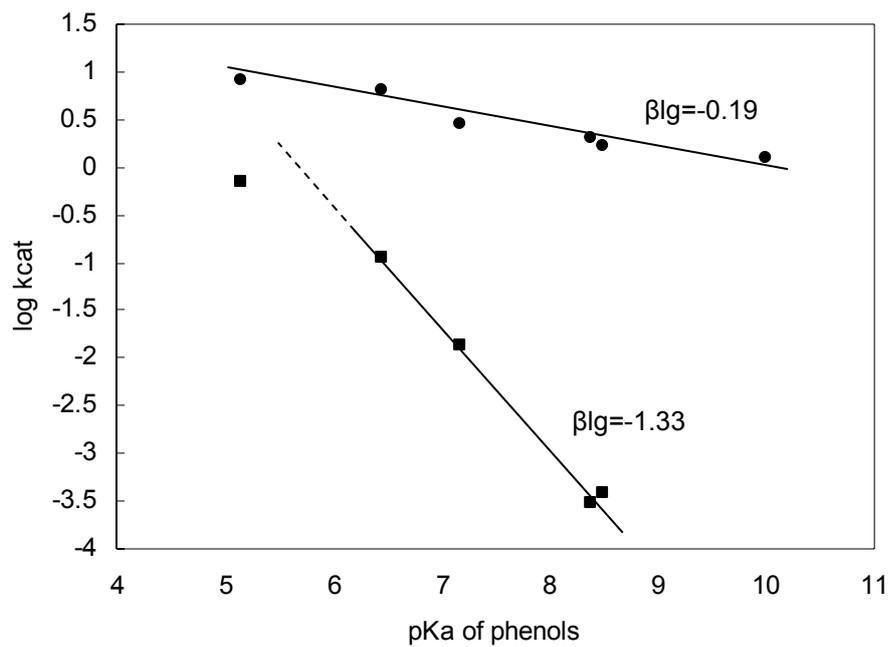


圖 3-8、Brønsted plot $\log k_{cat}$ 對受質離去基 pK_a 作圖

● : wild type ■ : D299G

(Na_2HPO_4 50mM pH 6.5, $T=25^\circ C$, $[E]=0.028 \mu g / \mu L$)

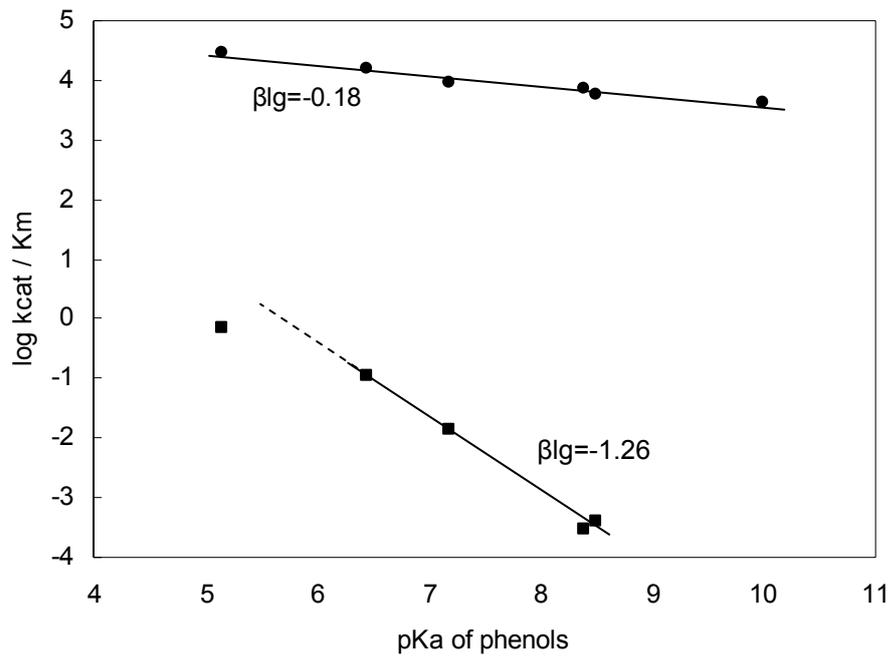


圖 3-9、Brønsted plot $\log k_{cat} / K_m$ 對受質離去基 pK_a 作圖

● : wild type ■ : D299G

(Na_2HPO_4 50mM pH 6.5, $T=25^\circ C$, $[E]=0.075 \mu g / \mu L$ in $pK_a < 8$

$[E]=0.1 \mu g / \mu L$ in $pK_a > 8$)

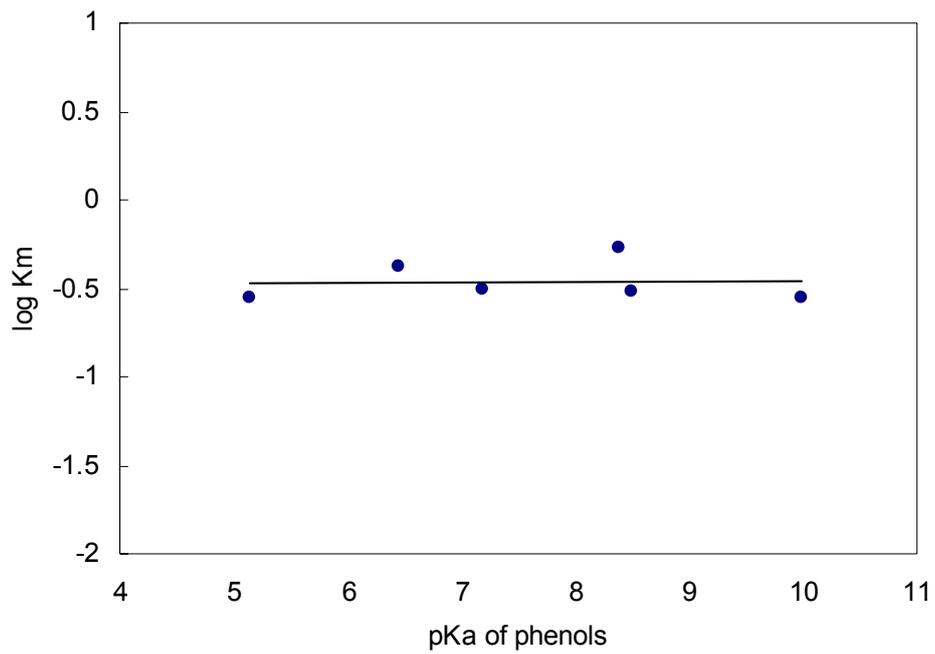
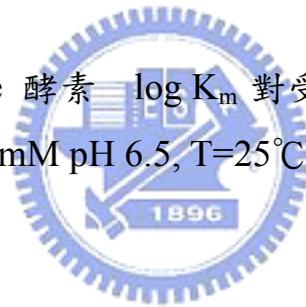


圖 3-10、wild type 酵素 $\log K_m$ 對受質離去基 pK_a 作圖
(Na_2HPO_4 50mM pH 6.5, $T=25^\circ\text{C}$, $[\text{E}]=0.028 \mu\text{g} / \mu\text{L}$)



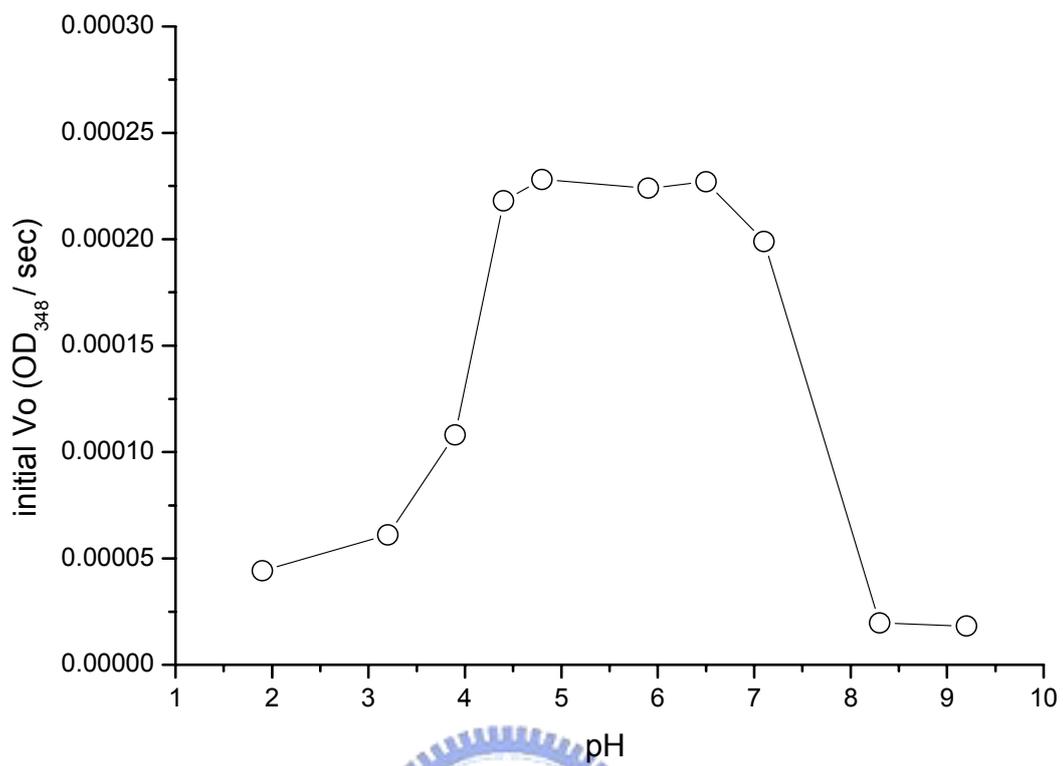


圖 3-11、酸鹼值對 D299G 突變酵素活性之影響
 (PNPAF 受質[S]=0.1 mM, [E]=0.0324 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, T=25°C, pK_a 4.1、7.3)

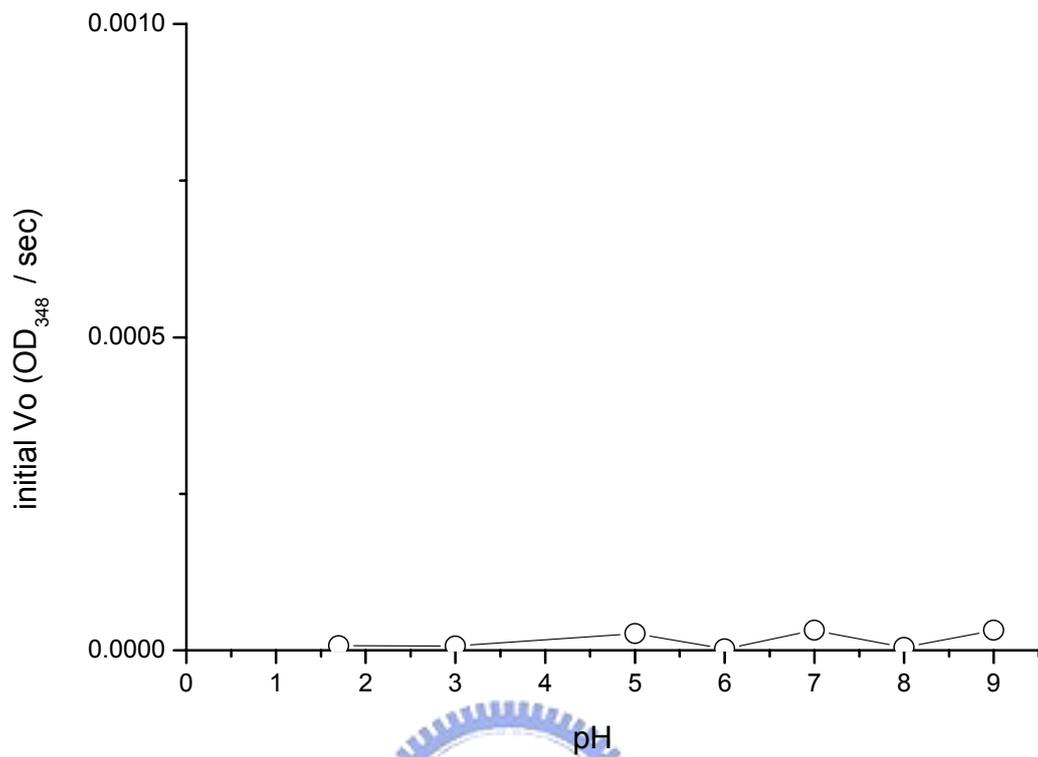


圖 3-12、酸鹼值對 E223Q 突變酵素活性之影響
 (PNPAF 受質[S]=0.1 mM, [E]=0.0324 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, T=25°C)

3-3-4 抑制劑之研究

抑制作用之研究可有效地用以模擬酵素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)，另一為可逆抑制劑 (reversible inhibitors)。利用不可逆抑制劑直接與活性位置作用，可決定何種胺基酸是直接或間接在催化過程中扮演重要角色。而利用可逆抑制劑可探索酵素活性區之特性，並且幫助瞭解催化反應機構。

本實驗嘗試以合成之 1,2-epoxy-3-(α -L-arabinofuranosyl)propane (EAFP)(附錄六)來進行酵素抑制，此類型之抑制劑通常為不可逆抑制劑，我們預期它會與酵素的重要胺基酸 (nucleophile 或 general acid / base) 產生共價鍵並結合 LC / MS / MS-peptide mapping 技術以直接鑑定重要胺基酸殘基之位置。

首先我們進行活性測試，將酵素與抑制劑混合，每過一段時間進行酵素活性測試，由圖 3-13 可知隨時間的變化，酵素沒有明顯的被抑制，與對照組未加抑制劑的反應可得知活性的下降是酵素置於室溫下自然的活性喪失。假如是不可逆抑制劑，酵素與抑制劑反應後期活性會有很明顯的下降，又經 LC / MS 分析並未見預期之蛋白質質譜，由此可推論此抑制劑不是不可逆抑制劑。

為了探討此化合物之可能抑制作用我們進行了動力學的實驗以 EAFP 當抑制劑，同時和酵素及不同濃度之 CNPAF 反應，將得到的數據以雙倒數作圖，從圖 3-14 可以看出三條線相交於 Y 軸，屬於競爭型抑制作用，其 V_{max} 不變但 K_m 變大。這表示 EAFP 和 CNPAF 會同時競爭酵素的活化區，但是它不會與酵素有共價的鍵結形成不可逆抑制作用，是一個競爭型抑制劑 (competitive inhibitor)，其 K_i 值為 4.85mM。

本實驗室曾以 N-bromoacetylglucosyl amine 抑制劑，結合 LC/MS/MS-peptide mapping 技術成功地將 family 3 之 β -glucosidase 的一般酸/鹼基 (general acid / base) 胺基酸明確的鑑定出來，所以

N-bromoacetyl arabinofuneryl amine 或許有機會當作 ABF 的不可逆抑制劑；此外在醣類環上第二個碳上將 hydroxy group 置換成氟原子，如下圖，也是常用來作為不可逆抑制劑，可用於探測親核基之位置，目前我們已著手合成此兩類型之抑制劑，期望可與酵素形成共價性之鍵結。

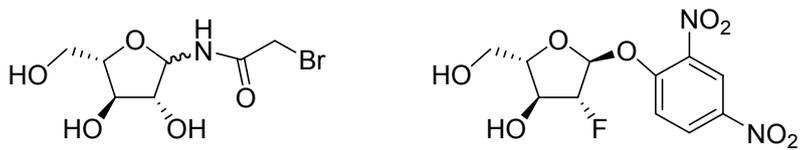


圖 3-15、兩類 arabinofuranosidase 不可逆抑制劑



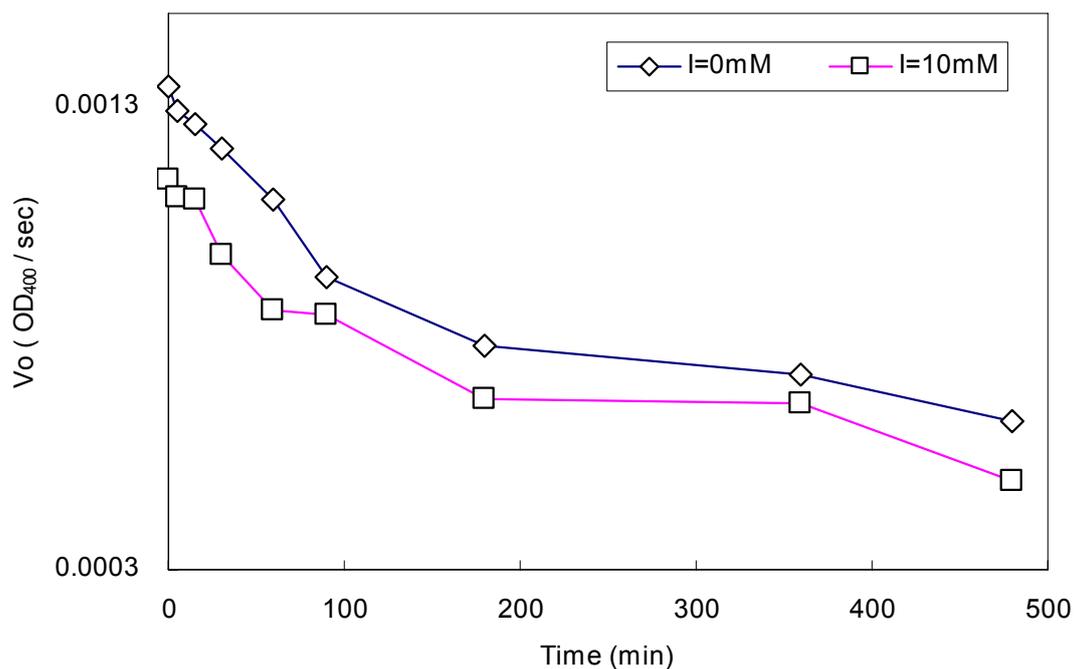


圖 3-13、EAFP 隨時間變化對酵素之抑制作用

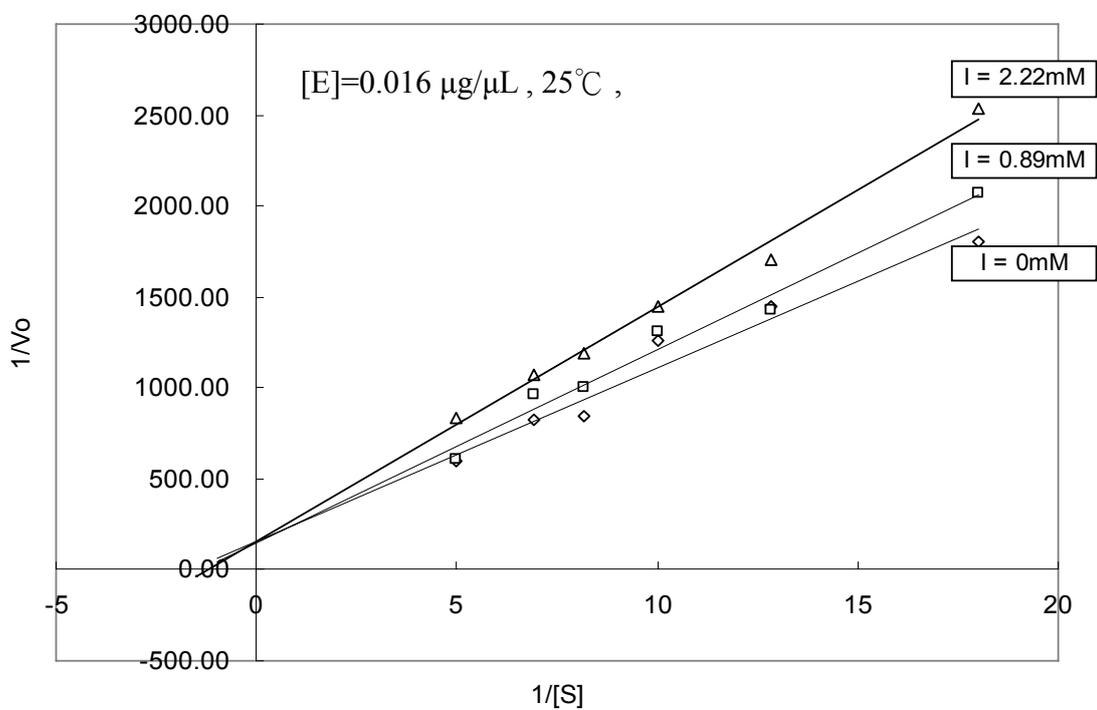


圖 3-14、EAFP 和 CNPAF 之間的抑制關係

阿拉伯呋喃糖苷酵素 α -L-arabinofuranosidase (ABF)被分類成四個家族 (家族 43、51、54 和 62)⁽⁸⁾，其中家族 51 和 54 對於含有阿拉伯糖的多醣類具有不同受質的專一性，以構型保留 (retention of the anomeric configuration) 之方式水解糖苷鍵(Pitson *et al*)。而家族 43 則以反轉機制 (inversion mechanism)的方式水解糖苷鍵，然而家族 62 的催化方式尚未被確認。比較家族 51 和 54 兩構型保留 (retention of the anomeric configuration) 的阿拉伯呋喃糖苷酵素 α -L-arabinofuranosidase (ABF)。在 2002 年 Dalia Shallom *et al* 等人^(10,29)，將家族 51 之 α -L-arabinofuranosidase (ABF)作了詳細的研究，包括動力學探討以及重要胺基酸的鑑定，2003 年相同一組研究團隊將家族 51 之酵素結晶並得到 X-ray 之實驗數據，而家族 54 僅在 2004 年由 Akimasa Miyanaga 研究團隊發表酵素結晶之 X-ray 之實驗數據，在本研究之前並無完整之動力學數據。

根據文獻^(10,29)所記載，在家族 51 中其 α -L-arabinofuranosidase 為兩步驟取代反應，其重要的胺基酸殘基為 E175 (general acid/base)、E294 (nucleophile)並由結晶數據得知兩者距離為 4.7Å，酵素有轉醣之能力，並且由其動力學數據得知其速率決定步驟為 dearabinosylation step，而我們所作的家族 54 酵素亦具有轉醣之功能，動力學數據顯示其速率決定步驟亦為 dearabinosylation step。

家族 54 之 α -L-arabinofuranosidase 之結晶數據顯示⁽²²⁾，其 D299 (general acid/base)以及 E223 (nucleophile)為其重要胺基酸兩者距離為 5.6 Å，然而在 E223G 突變株酵素裡添加外來化學試劑(Sodium azide 0.5M-3M 以及 MeOH 0.5M-2M) 並未得到活性的挽回 (chemically rescue) 這與家族 51 有不同之結果。

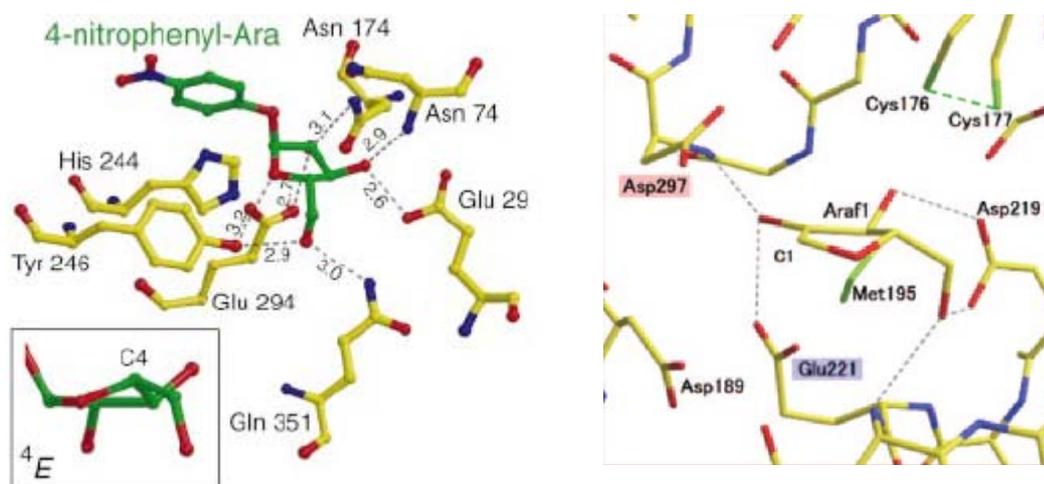


圖 3-16、(A) 家族 51 之結構圖⁽²⁹⁾ (B) 家族 54 之結構圖⁽²²⁾



第四章 結論

1. 利用本實驗室已發展完善的純化流程，純化出 α -L-arabinofuranosidase (ABF)，其均質度約在 90% 以上，酵素單體分子量約 50kDa 左右。
2. 成功的合成出芳香類- α -L-阿拉伯糖苷化合物受質，以利作酵素動力學之研究。
3. 以不同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 NMR 光譜可知酵素有轉糖反應，並以構型保留的機制進行催化，並且依據產物之比例可知各催化反應經由相同的反應中間體，因此推測酵素催化反應為兩步驟取代反應。
4. 以受質離去基之 pK_a 與 $\log k_{cat}$ 及 $\log k_{cat} / K_m$ 作圖可得 Brønsted plot。由 Brønsted plot 及共同反應中間體可推論此酵素之催化機構為兩步驟取代反應，即為酵素糖基化 (arabinosylation) 及去糖基化 (dearabinosylation)，由於其 $\beta_{lg} = -0.19$ 左右，顯示離去基的強弱在催化過程中並非速率決定步驟，即去糖基化是催化反應之速率決定步驟，並由突變酵素之研究與同屬第 54 家族之 α -L-arabinofuranosidase 之蛋白質結構分析得知 E223 與 D299 是此酵素重要胺基酸殘基，並以 D299G 突變酵素進行 Brønsted plot 研究分析，可得 $\beta_{lg} = -1.3$ 左右，顯示除去 D299 後催化反應之速率決定步驟改變為糖基化步驟，雖然外加親和試劑之“活性挽救”研究並未提供直接證明 E223 為親核基、D299 為一般酸鹼基 (general acid / base)，但 E223Q 以及 D299G 之催化活性僅為 wild type 酵素之 1/1000 或更小，可得知此兩胺基酸殘基在酵素催化反應上的重要性。
5. 以 1,2-epoxy-3-(α -L-arabinofuranosyl)propane 化合物用來當成酵素的不可逆抑制劑對酵素進行抑制反應，此類型之酵素抑制劑很可惜的不能與酵素作親和性的標誌，無法用以鑑定重要胺基酸之位置，進一步研

究酵素與該化合物的關係得知其為競爭型之抑制劑， K_i 值為 4.85 mM。

