

目錄

中文摘要.....	i
英文摘要.....	iii
謝誌.....	v
目錄.....	vi
表目錄.....	ix
圖目錄.....	x
第一章 緒論.....	1
1-1 岩藻糖苷水解酶 α -L-fucosidase (EC 3.2.1.51) 之生物功能.....	1
1-1-1 岩藻糖苷水解酶之簡介及其重要性.....	1
1-1-2 岩藻糖苷水解酶之水解催化反應機制.....	3
1-2 哺乳類動物岩藻糖苷水解酶概述.....	6
1-2-1 哺乳類動物岩藻糖苷水解酶介紹.....	6
1-2-2 人類岩藻糖苷水解酶介紹.....	11
1-3 岩藻糖苷水解酶抑制劑的介紹.....	13
1-4 研究目的.....	15
第二章 實驗方法.....	16

2-1 Human α -L-fucosidase 重組酵素純化.....	16
2-1-1 一般敘述.....	16
2-1-2 Human α -L-fucosidase 表現系統的建立.....	17
2-1-3 胞內粗提液的取得以及純化.....	17
2-1-4 酵素活性測試.....	19
2-1-5 決定蛋白質分子量以及純度.....	19
2-1-6 LC-Mass 決定蛋白質的分子量.....	20
2-1-7 蛋白質濃度的測定.....	20
2-2 芳香類 α -L-岩藻糖苷化合物以及具抑制效果藥物衍生物的合 成.....	21
2-2-1 一般敘述.....	21
2-2-2 芳香類 α -L-岩藻糖苷化合物及 Fuconolactone 的合成.....	22
2-2-3 2-(2-aminoethylamino) ethanol 衍生物合成.....	25
2-3 酵素催化特性之研究.....	27
2-3-1 一般敘述.....	27
2-3-2 酵素 k_{cat} 、 K_m 以及 Brønsted plot 的研究.....	27
2-3-3 Fuconolactone 抑制作用測定.....	28
2-4 藥物篩選.....	29
2-4-1 一般敘述.....	29

2-4-2 抑制劑篩選.....	29
2-4-3 抑制作用之研究.....	30
2-4-4 抑制劑對不同酵素專一性測試.....	32
2-4-5 抑制劑對不同來源的岩藻糖苷水解酶專一性測試.....	33
第三章 結果與討論.....	34
3-1 Human α -L-fucosidase 重組酵素表現與純化.....	34
3-1-1 重組酵素的表現.....	34
3-1-2 Human α -L-fucosidase 的酵素粗提液純化.....	35
3-1-3 Human α -L-fucosidase 酵素的分子量.....	39
3-2 酵素催化特性之研究.....	40
3-2-1 酸鹼值對酵素活性的影響.....	40
3-2-2 催化速率決定步驟之探討.....	43
3-2-3 Fuconolactone 抑制作用測定.....	45
3-3 藥物篩選.....	46
3-4 有效抑制劑衍生物的測試與合成.....	48
3-4-1 抑制劑之類型分析與專一性之探討.....	48
3-4-2 抑制劑對不同酵素專一性測試.....	55
3-4-3 抑制劑對不同來源的岩藻糖苷水解酶專一性測試.....	56

3-4-4 可逆抑制劑抑制常數的測定.....	57
3-4-5 Ethambutol 相關類型藥物及衍生物抑制之研究.....	58
3-4-6 有效抑制劑結構分析與討論.....	61
3-4-7 不可逆抑制劑抑制作用測定.....	64
3-5 未來研究方向.....	66
第四章 結論.....	67
第五章 參考文獻.....	69

附錄

附錄一.....	79
附錄二.....	80
附錄三.....	87
附錄四.....	89
附錄五.....	99

表目錄

表 1-1 哺乳類動物的 α -L-岩藻糖苷水解酶特性比較.....	10
表 1-2 哺乳類動物的 α -L-岩藻糖苷水解酶活性比較.....	10

表 2-1 2-(2-aminoethylamino) ethanol 相關衍生物.....	27
表 3-1 利用 Vector NTI 軟體分析酵素分子量.....	39
表 3-2 具有抑制效果的藥物.....	47
表 3-3 抑制劑專一性比較.....	55
表 3-4 比較 Ethambutol 對 4 種不同來源 α -L-fucosidase 抑制效果...	56
表 3-5 2-(2-aminoethylamino) ethanol 相關衍生物抑制性比較.....	59

圖目錄

圖 1-1 L-fucose.....	1
圖 1-2 Typical mammalian complex <i>N</i> -glycans.....	2
圖 1-3 α -L-岩藻糖苷水解酶反應機制推測及過度態結構.....	5
圖 1-4 Fuconojirimycin.....	14
圖 1-5 Fuconojirimycin derivatives with low K_i value.....	15
圖 2-1 受質合成方法.....	22
圖 2-2 Fuconolactone 合成方式.....	24
圖 3-1 大腸桿菌生長曲線與酵素活性的比較.....	34
圖 3-2 SP (陽離子交換樹脂) 管柱層析圖.....	35
圖 3-3 Q (陰離子交換樹脂) 管柱層析圖.....	36

圖 3-4 G75 (凝膠樹酯) 管柱層析圖.....	36
圖 3-5 Human α -L-fucosidase 純化之 SDS-PAGE 分析圖.....	37
圖 3-6 以 G-200 管柱純化 human α -L-fucosidase 之 SDS-PAGE 分析 圖.....	37
圖 3-7 酵素分子量之質譜分析圖.....	39
圖 3-8 以雙倒數作圖法求解酵素對 PNPF 之 K_m 以及 k_{cat}	41
圖 3-9 pH profile of human α -L-fucosidase.....	42
圖 3-10 Wild type human α -L-fucosidase 活性與 pH 值的關係.....	43
圖 3-11 Native human α -L-fucosidase 活性與 pH 值的關係.....	44
圖 3-12 Brønsted plot $\log k_{cat}$ 對受質離去基 pKa 作圖.....	46
圖 3-13 Initial burst.....	45
圖 3-14 Fuconolactone 以及酵素催化水解反應可能過渡態結構.....	45
圖 3-15 Human α -L-fucosidase 對 Fuconolactone 抑制常數圖.....	46
圖 3-16 競爭型抑制劑-Ethambutol.....	52
圖 3-17 競爭型抑制劑-Mitoxantrone.....	53
圖 3-18 無競爭型抑制劑-Dequalinium chloride.....	54
圖 3-19 Human α -L-fucosidase 對 Ethambutol 抑制常數圖.....	57
圖 3-20 <i>Thermotoga maritime</i> α -L-fucosidase 對 Ethambutol 抑制常數 圖.....	58

圖 3-21 Ethambutol 相關類型結構.....	59
圖 3-22 Mitoxantrone 以及 Ethambutol 結構比較.....	60
圖 3-23 Moxifloxacin 相關類型結構.....	61
圖 3-24 Mitoxantrone 相關類型結構.....	62
圖 3-25 Dequilinium chloride 相關類型結構.....	63
圖 3-26 Cisplatin 與 Ebselen 的結構.....	63
圖 3-27 Cisplatin 水的加成.....	64
圖 3-28 不可逆抑制劑-Cisplatin.....	65
圖 3-29 Ebselen 與蛋白質反應圖.....	66

