

# 第一章 緒論

## 1-1 岩藻糖苷水解酶 ( $\alpha$ -L-fucosidase) 之生物功能

### 1-1-1 L-岩藻糖與岩藻糖苷水解酶之簡介及其重要性

L-岩藻糖 (圖 1-1) 是一種常見於生物體中的去六氧半乳糖 (6-deoxy-L-galactose)，往往可以在細胞中 *N*-linked 或是 *O*-linked 鍵結的糖苷以及醣脂中發現。在哺乳類動物中，L-岩藻糖的糖苷類調控許多特別的生物活性，其中包含了血液的傳輸<sup>1</sup>、透過 selectine 調節白血球與內皮組織之間的作用<sup>1</sup>、宿主-微生物之間的交互作用<sup>1, 2</sup> 以及一些生長、受精及訊號的傳遞等等<sup>1</sup>。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糖大量產生<sup>3, 4</sup>；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)<sup>5</sup>。

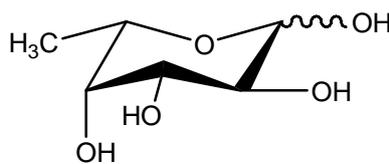


圖 1-1. L-fucose

L-岩藻糖大部分會透過各種不同的鍵結方式如  $\alpha$ -1, 2,  $\alpha$ -1, 3,  $\alpha$ -1, 4,  $\alpha$ -1, 6 與半乳糖 (galactose) 或是 *N*-乙醯葡萄糖胺 (*N*-acetyl glucosamine) (圖 1-2) 形成鍵結，這些具有 L-岩藻糖修飾的醣化物則具有各種不同的生理活性，如人體中很多糖苷 (A, B, H, and Lewis 抗原) 的非還原端常常具有不同的 L-岩藻糖修飾，而這些抗原則是血型分類的重要辨識指標<sup>1, 6</sup>。除此之外，L-岩藻糖還涉及植物本



## 1-1-2 $\alpha$ -L-岩藻糖苷水解酶之水解催化反應機制

醣類水解酵素通常透過兩大類不同的方式水解醣苷鍵結，其中一種是構型保留機制 (retention of the anomeric configuration)，另一種則是構型反轉機制 (inversion of the anomeric configuration)。不論是透過哪一種機制進行反應，通常都需要酵素側鏈上的羧酸基協助完成整個水解反應。由於醣苷鍵是自然界中最穩定的鍵結之一，半生期高達百萬年以上，醣類水解酵素能夠催化反應使其水解速率增加超過  $10^{17}$  倍，因此這一類的酵素也是現在已知的幾種高效率的催化劑之一<sup>30</sup>。

$\alpha$ -L-岩藻糖苷水解酶 ( $\alpha$ -L-Fucosidase,  $\alpha$ -L-Fucoside fucosylhydrolase, EC 3.2.1.51) 是一種外切型醣苷水解酵素，且被歸類為醣類水解酵素第 29 家族 (CAZY GH-29)，而且這一個家族只有  $\alpha$ -L-岩藻糖苷水解酶這一種單一酵素被歸類為這個家族，主要是因為這一類酵素胺基酸的序列具有很高的相似性，因此這類酵素的摺疊方式、立體結構、反應活性中心、反應機制以至於受質的專一性等等性質具有某種程度上的類似<sup>31</sup>。

醣類水解酵素第 29 家族的酵素主要是透過構型保留的反應機制進行水解反應<sup>31,32</sup>；構型保留的水解酵素具有兩個含羧酸的胺基酸催化活性中心且透過兩步驟雙取代的方式進行催化反應；首先，反應第一步驟 glycosylation 開始時，其中一般酸鹼催化活性位置 (general acid/base) 透過酸催化 (general acid) 質子化醣分子上的氧原子並穩定離去基，而另外一個催化活性中心 (catalytic nucleophile) 會進行親核攻擊以形成共價鍵結產生一個與原本受質相反的異位性中心的反應中間物 (glycosyl-enzyme intermediate)；第二步驟進行 deglycosylation 時一般鹼催化 (general base) 活化水分子使其攻擊反應中間物的異位性中心，而此時所得

到的醣產物具有與受質相同的異位性中心結構。在這兩個不同步驟的過度態時，都會有 oxocarbenium ion 的結構產生<sup>32</sup>，反應中間態的結構則是產生  $\beta$ -L-fucosyl-enzyme intermediate，如圖 1-3 所示。

醣類水解酵素第 29 家族其雙取代構型保留的反應機制已逐漸獲得證實。從 1987 年 White 等人從人類肝臟  $\alpha$ -L-岩藻醣苷水解酶推測此反應機制<sup>33</sup>，持續有各個研究團隊取得不同來源的  $\alpha$ -L-岩藻醣苷水解酶<sup>34-37</sup> 並再次驗證了這個反應機制。另一方面，活性中心的鑑定也是了解醣類水解酵素運作的另一個方向；早期的研究中曾利用幾種化學物質例如碳二醯胺（carbodiimide）或是汞的化合物與特定的胺基酸反應以抑制酵素的活性，藉此了解並鑑定可能參與催化反應的胺基酸類型<sup>38,39</sup>，其中帶有羧酸或是帶有硫氫基的胺基酸會與這些化學物質反應形成共價鍵結而影響酵素本身的活性，但是真正參與醣類水解反應的則主要以帶有羧酸的胺基酸殘基為主。



近幾年來，探討構型保留機制的醣類水解酵素活性中心有幾種不同的方式，除了利用 mechanism-based 不可逆的抑制劑對酵素<sup>40</sup> 進行標定之外，還有鑑定蛋白質的晶體結構或是透過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方式<sup>41</sup>。雖然早期已有多次報導萃取純化以取得各種不同來源的  $\alpha$ -L-岩藻醣苷水解酶<sup>34-37</sup>，但是大部分不同來源的  $\alpha$ -L-岩藻醣苷水解酶的催化活性中心仍未被解出，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。

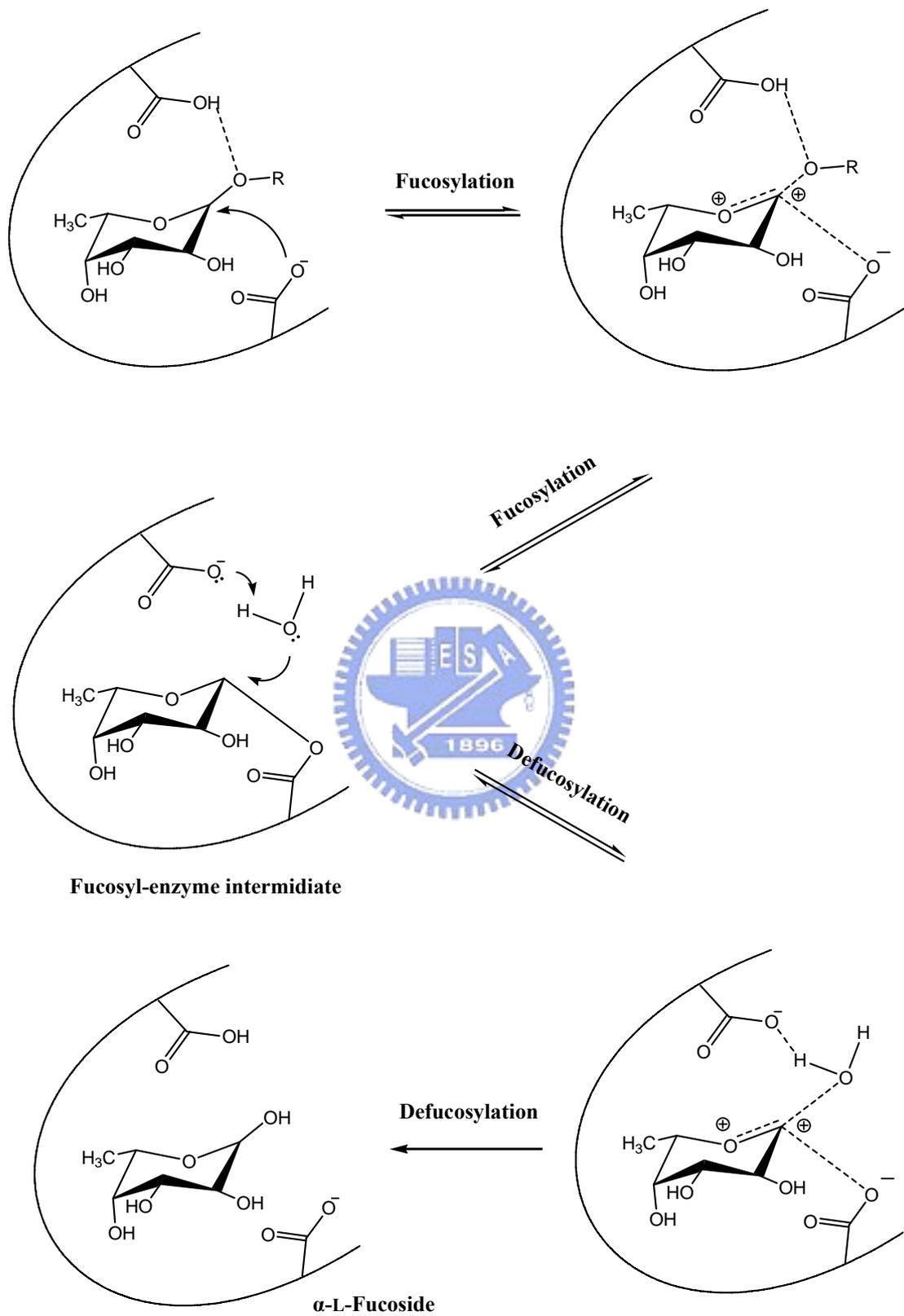


圖 1-3.  $\alpha$ -L-岩藻糖苷水解酶反應機制推測以及過渡態結構

## 1-2 哺乳類動物 $\alpha$ -L-岩藻糖苷水解酶概述

### 1-2-1 哺乳類動物 $\alpha$ -L-岩藻糖苷水解酶的介紹

$\alpha$ -L-岩藻糖苷水解酶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  $\alpha$ -L-岩藻糖苷水解酶並對其性質進行深入的研究，而這一系列的研究除了釐清  $\alpha$ -L-岩藻糖苷水解酶的生理意義之外，更能促使醫學上發展出有效治療與  $\alpha$ -L-岩藻糖苷水解酶相關的罕見遺傳性疾病 Fucosidosis<sup>42</sup> 以及 English Springer Spaniels<sup>43</sup>。

經由序列比對中得知，哺乳類動物的  $\alpha$ -L-岩藻糖苷水解酶具有較高的相似性，因此這一類來源的岩藻糖苷水解酶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  $\alpha$ -L-岩藻糖苷水解酶具有類似的 Antigenic sites (epitopes)；也就是說，不同來源的哺乳類動物的岩藻糖苷水解酶能夠與同一種抗體進行互動，例如人類肝臟  $\alpha$ -L-岩藻糖苷水解酶抗體也能夠與其它哺乳類動物肝臟的岩藻糖苷水解酶進行作用<sup>44</sup>；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  $\alpha$ -L-岩藻糖苷水解酶進行作用<sup>45</sup>。造成這一類抗原抗體作用的原因雖然還沒有明確的答案，但是猜測可能是基因序列上的相似性或是其他的轉譯後修飾產生了這些特殊的性質。

## 唾液酸修飾的醣蛋白 - $\alpha$ -L-岩藻醣苷水解酶

利用 SDS-PAGE 分析  $\alpha$ -L-岩藻醣苷水解酶，通常會有 1 種或是 2 種分子量相近的蛋白質，大小通常在 50-60 kDa 左右。若將  $\alpha$ -L-岩藻醣苷水解酶中加入神經胺酸酶 (neuraminidase) 進行反應後，較大的 unit 其分子量會減小；當使用單株抗體、多株抗體進行西方墨點分析，或是將 CNBr digestion 的產物進行 peptide mapping 後，結果顯示這些 unit 是不同的，而非屬於單一相同的 unit。

IEF (isoelectric focusing) 的研究也證明了  $\alpha$ -L-岩藻醣苷水解酶具有各種不同的異構型式 (iso form)。若將  $\alpha$ -L-岩藻醣苷水解酶中加入神經胺酸酶進行反應，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  $\alpha$ -L-岩藻醣苷水解酶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  $\alpha$ -L-岩藻醣苷水解酶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  $\alpha$ -L-岩藻醣苷水解酶的唾液酸修飾較源自於肝臟中的  $\alpha$ -L-岩藻醣苷水解酶來的高<sup>46</sup>，老鼠的  $\alpha$ -L-岩藻醣苷水解酶也曾經被發現過具有唾液酸修飾的現象<sup>47</sup>。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<sup>48</sup>，Alhadef 等人曾經發現具有唾液酸修飾後的人類肝臟  $\alpha$ -L-岩藻醣苷水解酶對 goat anti-human liver  $\alpha$ -L-fucosidase 抗體的作用較一般修飾較少的異構型式來得差。

$\alpha$ -L-岩藻醣苷水解酶的特徵除了具有唾液酸修飾之外，通常還會有各種不同的醣基化現象。胞內與胞外的  $\alpha$ -L-岩藻醣苷水解酶具有不同程度的醣類修飾。早期的單糖組成分析的结果顯示， $\alpha$ -L-岩藻醣苷水解酶也是醣蛋白的一種，其中醣的組成約佔整個分子量的 7-8%。而這些醣基化的修飾中，一類是屬於甘露寡醣 (oligomannoside) 為主的醣類修飾；另一種則屬於 *N*-乙醯基乳糖胺

(*N*-acetylactosamine) 的醣類修飾；最後一種則是混合型的寡醣修飾。而這些寡醣中可能具有甘露糖、葡萄糖、乳糖、岩藻糖等單糖分子。80 年代末期，Beem<sup>49</sup> 等人以及另一個研究團隊 Argad<sup>50</sup> 等人曾經利用氫原子核磁共振的技術分析 Pronase digestion 處理過的人類肝臟  $\alpha$ -L-岩藻醣苷水解酶，其中可以觀測到 9 個甘露寡醣以及 6 個 *N*-乙醯基乳糖胺的醣類修飾，但沒有其他醣類的寡糖修飾；這個結果與後來 Fukushima<sup>51</sup> 等人以及 Aronson<sup>52</sup> 等人從基因序列上推測出一個  $\alpha$ -L-岩藻醣苷水解酶的 unit 可能具有至多四種醣基化修飾的結果大致符合。

雖然  $\alpha$ -L-岩藻醣苷水解酶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<sup>53</sup>，缺少醣類修飾的  $\alpha$ -L-岩藻醣苷水解酶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  $\alpha$ -L-岩藻醣苷水解酶於溶酶體的酸性環境中穩定運作。



## 哺乳類動物 $\alpha$ -L-岩藻糖苷水解酶動力學上的特質

$\alpha$ -L-岩藻糖苷水解酶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  $\alpha$ -L-岩藻糖苷水解酶通常對水解  $\alpha$ -1, 2 鏈結至半乳糖上的岩藻糖具有較高的活性；對於  $\alpha$ -1, 3、 $\alpha$ -1, 4、 $\alpha$ -1, 6 鏈結至 *N*-acetylglucosamine 的岩藻糖反應性則是相對較弱。除了岩藻糖本身的鏈結位置會影響酵素的反應活性之外，岩藻糖鄰位所鏈結的醣也會對酵素的反應性產生影響<sup>54, 55</sup>。除此之外，受質的大小也會對酵素的活性產生影響； $\alpha$ -L-岩藻糖苷水解酶對較小的受質具有較佳的反應性<sup>56</sup>。Sandhoff 等人指出，部分的溶酶體蛋白需要其他的物質進行反應後活化才能水解醣酯的反應<sup>57</sup>，例如加入牛磺膽酸鈉 (sodium taurocholate) 可以促進  $\alpha$ -L-岩藻糖苷水解酶水解 H 抗原上的岩藻糖<sup>58</sup>。比較特別的是，人類腦中以及肝臟的  $\alpha$ -L-岩藻糖苷水解酶在低 pH 值時 (3.4) 則不需要任何的蛋白質或是化學物質進行活化即可以自行水解 fucogangliosides<sup>59</sup>。

通常  $\alpha$ -L-岩藻糖苷水解酶大多使用 *p*-nitrophenyl- $\alpha$ -L-fucopyranoside (PNPF) 或是 4-methylumbelliferyl- $\alpha$ -L-fucopyranoside (4-MU-fucoside) 為受質進行活性測試。針對這兩種不同的受質，根據文獻中的數據整理得出<sup>60</sup>，岩藻糖苷水解酶活性最佳的 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。以 PNPF 為受質，其中 Michaelis constant  $K_m$  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 1-1. 哺乳類動物的  $\alpha$ -L-岩藻糖苷水解酶特性比較<sup>60</sup>

$\alpha$ -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	7	NANA	Alhadeff and Janowsky, 1978
	390*	63	7	—	DiCioccio <i>et al.</i> , 1982
Human placenta	50, 200*	—	4	—	DiMatteo <i>et al.</i> , 1976
	305*	25, 51, 55	5	Man, GlcNAc Gal, NANA	Turner, 1979
Human spleen	50, 100*	50	—	Man, GlcNAc, NANA	Chien and Dawson, 1980
Monkey brain	285*	73.5	6	—	Alam and Balasubramanian, 1978
Porcine thyroid	192‡	55	10	NANA	Grove and Serif, 1981
Rat epididymis	210-220†	47, 60	1	Yes	Carlsen and Pierce, 1972
	—	47-50	6	—	Leray <i>et al.</i> , 1986
	—	50, 57	—	—	Jain <i>et al.</i> , 1977
	—	54	—	—	Wright <i>et al.</i> , 1976
Rat liver	160*, 217†	55	Multiple	Man, Gal, GlcNAc Glc, NANA, Fuc	Opheim and Touster, 1977
	300*	—	—	—	—
Mouse liver	—	57, 63	Multiple	—	Laury-Kleintop <i>et al.</i> , 1987
Canine liver	90-150*	45-50	—	—	Barker <i>et al.</i> , 1988
	50*	—	—	—	—

\*Determined by gel filtration chromatography.

†Determined by sedimentation equilibrium analysis.

‡Determined by density gradient ultracentrifugation.



表 1-2. 哺乳類動物的  $\alpha$ -L-岩藻糖苷水解酶活性比較<sup>60</sup>

$\alpha$ -L-Fucosidase source	$(\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg})$		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
	—	—	1.1	—	—	—	Robinson and Thorpe, 1974
	—	—	—	0.06	—	3.9-4.0 (6-7)	Kress <i>et al.</i> , 1980
Human brain: soluble pellet	10.7	—	0.44	—	4.7 (6.6)	4.7 (6.6)	Alhadeff and Janowsky, 1977
	—	—	—	0.07	—	5.5	Hopfer <i>et al.</i> , 1990
Human serum	—	—	0.52	—	4.8 (6.1)	—	Alhadeff and Janowsky, 1978
	11.6	—	0.18	—	5.0	—	DiCioccio <i>et al.</i> , 1982
Human placenta	—	—	0.38	0.3	5.5	6.0	DiMatteo <i>et al.</i> , 1976
Human spleen	—	—	—	0.13	—	5.3	Chien and Dawson, 1980
	—	—	—	0.06	—	5.0	
Monkey brain	15.2	—	0.22	—	5.0 (6.0)	—	Alam and Balasubramanian, 1978
	—	—	—	—	5.0	—	Alam and Balasubramanian, 1979
Porcine thyroid	—	—	—	—	5.1	—	Grove and Serif, 1981
Rat cerebral cortex	—	—	1.33	—	4.3	—	Bosmann and Hemsworth, 1971
Rat epididymis	—	—	—	—	6.3	—	Carlsen and Pierce, 1972
	—	—	0.27	—	—	—	Jain <i>et al.</i> , 1977
Rat liver	27.0	—	0.19	—	5.7-5.9	—	Opheim and Touster, 1977
Mouse liver	—	—	—	0.05	—	5.5 (4.0)	Laury-Kleintop <i>et al.</i> , 1987b
Canine liver	—	—	—	0.28	—	7 (5.5)	Barker <i>et al.</i> , 1988

\*Determined using *p*-nitrophenyl- $\alpha$ -L-fucopyranoside.

†Determined using 4-methylumbelliferyl- $\alpha$ -L-fucopyranoside.

‡pH of shoulder of activity in parentheses.

## 1-2-2 人類岩藻糖苷水解酶的介紹

$\alpha$ -L-岩藻糖苷水解酶 ( $\alpha$ -L-Fucosidase) 是一種溶酶體酸性水解酶，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，是一種廣泛分布於人體內的一種糖類水解酶。

$\alpha$ -L-岩藻糖苷水解酶由 439 個胺基酸所組成的糖蛋白，在人體內呈多形性，有三型同功酶，即 Fu 1, Fu 2-1, Fu 2，是由 1 個位於第 1 號染色體短臂 (1, P34) 上基因位點的 2 個對偶基因 ( $Fu^1, Fu^2$ ) 所表達，而 Fucosidosis 的患者通常還會具有第三個 silent 對偶基因  $^{61}Fu^0$ ；高活性的  $\alpha$ -L-岩藻糖苷水解酶由基因  $Fu^1$  所表達，低活性的則由基因  $Fu^2$  所決定，而 Fu 2-1 則由兩個基因的雜合子所決定。各型同功酶的活性不一，依次為  $Fu 1 > Fu 2-1 > Fu 2$ ，因此純合子型 (Fu1, Fu2) 表現為高活性或低活性的  $\alpha$ -L-岩藻糖苷水解酶，而雜合子 (Fu 2-1) 表現為中等活性。由於各人所表達的同功酶類型不同，所以正常人的  $\alpha$ -L-岩藻糖苷水解酶活性高低不一，大約有 10% 左右的  $\alpha$ -L-岩藻糖苷水解酶呈現低活性。

早期測定此酵素主要用於診斷遺傳性  $\alpha$ -L-岩藻糖苷水解酶缺乏症 (Fucosidosis)，缺乏  $\alpha$ -L-岩藻糖苷水解酶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)。組織細胞、尿液和血清中  $\alpha$ -L-岩藻糖苷水解酶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，這也是早期對  $\alpha$ -L-岩藻糖苷酶檢測的主要目的。

一般 Fucosidosis 的患者通常尿液中都有大量的醣肽，而其中最常見的則是 glycoasparagine<sup>62</sup>，這一類醣肽會大量的堆積，最有可能的原因是岩藻醣修飾後抑制了 glycoasparaginase 的分解，這是因為沒有岩藻醣苷水解酶將岩藻醣水解移除，岩藻醣會產生立體阻礙使得 glycoasparagine 堆積；抑制的現象也受到岩藻醣鍵結位向的影響， $\alpha$ -1, 6 鍵結的岩藻醣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  $\alpha$ -1, 6 鍵結的岩藻醣化合物<sup>63, 64</sup>。

而  $\alpha$ -L-岩藻醣苷水解酶基因的研究則指出，有超過 20 種以上的突變情形可能會導致 Fucosidosis，其中有部份也可能只是基因的多型性<sup>65, 66</sup>；這些突變中最常見的是於胺基酸序列中第 422 個位置產生胞嘧啶 (Cytosin) 變為胸腺嘧啶 (Thymine) 的點突變，這個突變的結果使得 Stop Codon 提早被執行 (CAA→TAA, Q422X)，而這種突變的狀況曾經在六個不同的家族中被發現<sup>67</sup>。

此外，亦有其他幾種疾病與  $\alpha$ -L-岩藻醣苷水解酶相關；在囊胞性纖維症 (cystic fibrosis) 患者中， $\alpha$ -L-岩藻醣苷水解酶在細胞內與外均會有不正常的分布<sup>68, 69</sup>。80 年代法國學者 Deugnier<sup>70</sup> 等研究發現，原發性肝癌患者的血清  $\alpha$ -L-岩藻醣苷水解酶活性會升高，並被眾多研究所證實<sup>71, 72</sup>。故  $\alpha$ -L-岩藻醣苷水解酶素可作為肝癌的腫瘤標誌物 (tumor marker)，若與 AFP ( $\alpha$ -fetoprotein) 聯合參照應用則大大提高了診療價值<sup>71, 72</sup>。 $\alpha$ -L-岩藻醣苷水解酶除了與肝癌具有相關性之外，關於直腸癌的研究也指出<sup>73, 74</sup>，直腸癌的患者其  $\alpha$ -L-岩藻醣苷水解酶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  $\alpha$ -L-岩藻醣苷水解酶活性會大幅下降約 50% 左右<sup>73</sup>；另一方面， $\alpha$ -L-岩藻醣苷水解酶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  $\alpha$ -L-岩藻醣苷水解酶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<sup>73, 74</sup>。

### 1-3 岩藻醣苷水解酶抑制劑的介紹

醣類水解酵素在生物體中往往具有關鍵的生理功能，例如這一類的酵素會參與內質網中醣蛋白上鍵結寡糖的修飾進而影響蛋白質的成熟、分泌、輸送等一系列的重要生物反應；另一方面，不同的醣類修飾可能會影響細胞與細胞之間的辨識或是細胞與病毒的交互作用。因此這一類的酵素遭到特定的抑制劑抑制之後，可能會改變生物反應的結果或是終止生物反應，進而會對生物體造成嚴重的影響。於正常運作的生物體中，抑制劑的效果並不是我們所樂於見到的；但是換個角度來看，抑制劑也能促使細菌或病毒等對人體有害的微生物死亡，例如部份的 anti-HIV 的藥物設計就是以此構想為基礎<sup>75, 76, 77</sup>。到目前為止，抑制劑的發展與應用於醫藥或是農業相關領域可說是潛力無窮。截至目前為止，約有一百種左右的醣類水解酵素抑制劑從各種不同的自然界來源中被發現<sup>78</sup>。

抑制劑的研究也有助於了解酵素活性區的結構特性以及親和性層析的發展，由於早期基因工程仍處於萌芽的階段，蛋白質的取得主要是透過組織中萃取的方式取得；而岩藻醣苷水解酶本身屬於酸性水解酵素，當緩衝液的 pH 值大於 7.5 時蛋白質會很快的失去活性，因此欲利用一般的純化方式如陰陽離子交換層析的方式分離純化並不容易；為有效提升蛋白質的純度，親和性層析是早期純化岩藻醣苷水解酶最常採用的方式。而具有良好抑制效果的化學物質通常對酵素具有較高的親和性，這一類的抑制劑往往是優良的 ligand，和膠體經過偶合反應後即能應用於蛋白質純化。

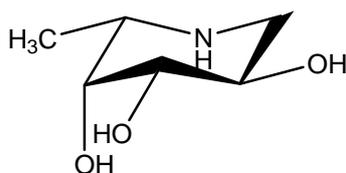


圖 1-4. Fuconojirimycin

近三十年來，各種不同的岩藻醣類衍生物陸續被合成出來，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。這一些抑制劑中，以 1,5-dideoxy-1,5-imino-L-fucitol (1-deoxy-L-fuconojirimycin) 的抑制效果較為突出， $K_i$  值大約在 nanomolar 的水準，因此對酵素的親和力非常的高；這個抑制劑在 1985 年被開發出來後<sup>79</sup>，曾經被利用於純化蛋白質<sup>80</sup>，但由於與酵素的親和力太高，酵素並不容易被流洗出來因此並不適用於親和性層析。

由於 fuconojirimycin 本身對酵素的絕佳親和性，其相關的衍生物也持續的被合成並探討；如 C5 位置的甲基已被證實對親和性具有極大的影響<sup>81</sup>，若移去甲基會使抑制能力大幅的降低千倍以上。此外，Wu 等人<sup>82, 83</sup> 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，而這一類的衍生物中有幾個對岩藻醣苷水解酶具有更高的親和性，其  $K_i$  值可以達到 picomolar 的水準，這些具有高親和性的抑制劑通常都是 C1 取代的衍生物。另一方面，該研究團隊也使用不同來源的岩藻醣苷水解酶進行抑制劑的研究，發現抑制能力對不同來源的岩藻醣苷水解酶會有高達一萬倍的差別；這個結果顯示，不同來源的酵素對醣類受質中 aglycon 部分的鍵結位置 (Binding site) 具有明顯的差異<sup>84</sup>。這方面關於結構的研究已經小有成果，但仍需要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。

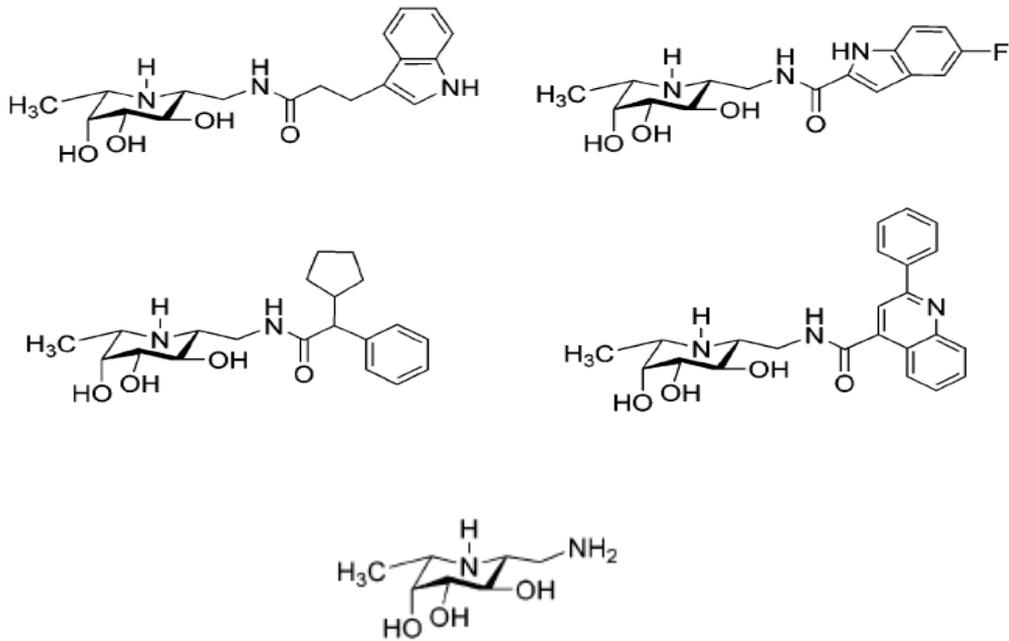


圖 1-5. Fuconojirimycin derivatives with low  $K_i$  value.

## 1-4 研究目的

利用基因工程的方法將 Human liver  $\alpha$ -L- fucosidase 岩藻糖苷水解酶的基因建構在大腸桿菌的表現系統中，透過大量表現並配合蛋白質純化的技術取得高純度的酵素，鑑定酵素的各種性質以及取得相關的反應動力學數據，藉以判斷酵素反應中的速率決定步驟。此外，高純度以及高濃度的酵素有助於取得蛋白質晶體結構可利用於判斷活性區的重要胺基酸殘基及其相關對應位置。

另一方面，利用 ELISA reader 篩選出相關抑制劑，並將篩選出的抑制劑應用於親和性層析以協助純化突變株的岩藻糖苷水解酶。利用突變株的酵素取得反應動力學相關數據，有助於必要胺基酸殘基的鑑定。