

第三章 結果與討論

3-1 Human α -L-fucosidase 重組酵素表現與純化

3-1-1 重組酵素的表現

將建構好的 human α -L-fucosidase gene 轉殖進入大腸桿菌 *E. coli* BL21(DE3) 中表現，利用 IPTG 誘導使其表現；圖 3-1 為攜有表現載體 (pET22b/afu) 之菌種，先培養約 8 小時後開始使用 IPTG 進行誘導，誘導約 18 小時後活性達到最佳，收菌後進行進一步的純化。

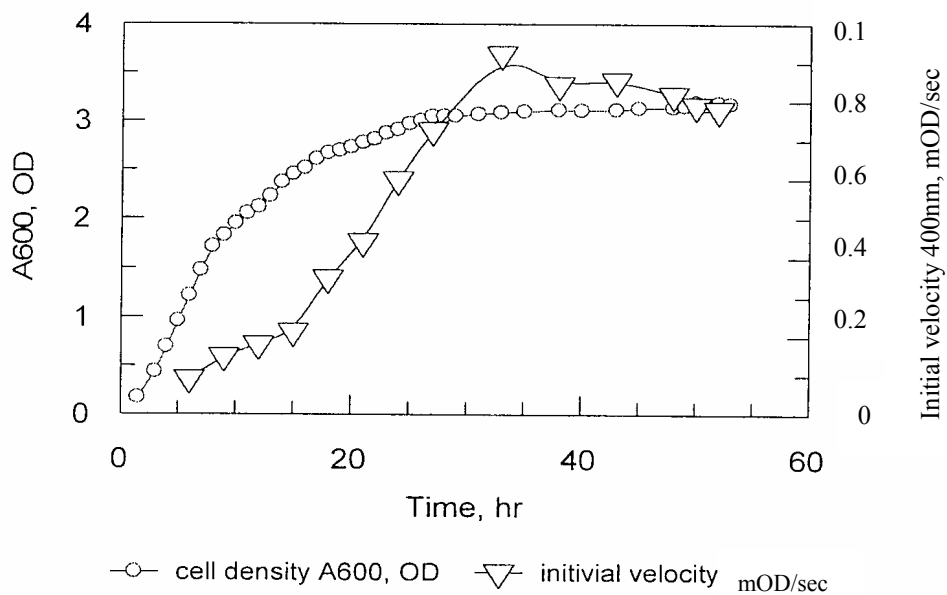


圖 3-1. 大腸桿菌生長曲線與酵素活性的比較

3-1-2 Human α -L-fucosidase 酵素粗提液純化

一般管柱層析

菌體以超音波震碎後，經銨鹽沉澱處理取得蛋白質粗提液。再利用管柱層析的方式進行純化。先後使用 SP column、Q column 以及 G75 column。實驗條件如實驗步驟所述。使用 SP 管柱進行層析時，AFU 在鹽類梯度 0.5 M-0.6 M 之間流洗出來（圖 3-2）；將具有活性的部分收集濃縮之後，再以 Q 管柱進行分離，AFU 在鹽類梯度約 0.3 M 流洗出來（圖 3-3），經過離子交換樹脂管柱的純化之後，蛋白質樣品以 SDS-PAGE 分析，得知 AFU 均質度（homogeneity）約為 40%（圖 3-5）。將此蛋白質粗純品以 G-75 管柱進行最後的純化，AFU 在 20 分鐘左右會流洗出來，透過 SDS-PAGE 分析，AFU 的均質度將會有效的提高至 95% 以上（圖 3-5）。另外，我們也嘗試採用 G-200 管柱純化 AFU，根據 SDS-PAGE 分析，AFU 經過 G-200 管柱層析之後其均質度也可達 95% 的水準（圖 3-6）。

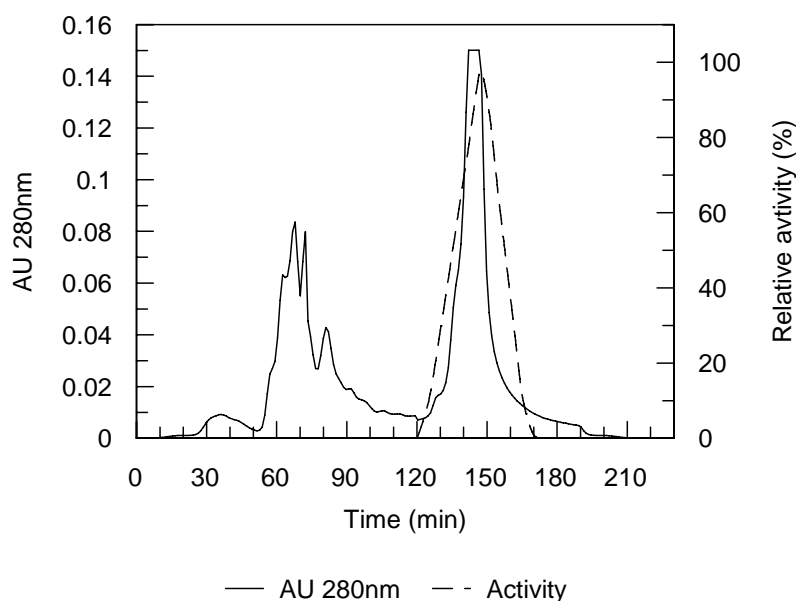


圖 3-2. SP（陽離子交換樹脂）管柱層析圖

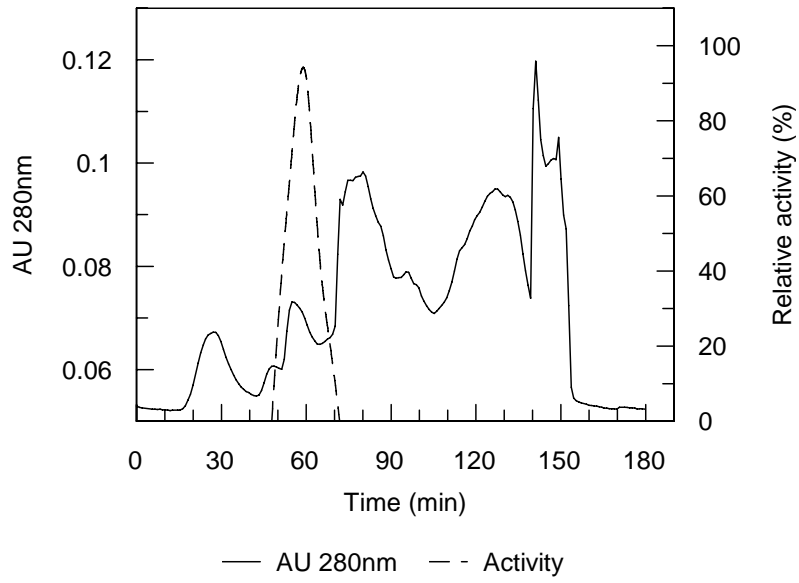


圖 3-3. Q (陰離子交換樹脂) 管柱層析圖

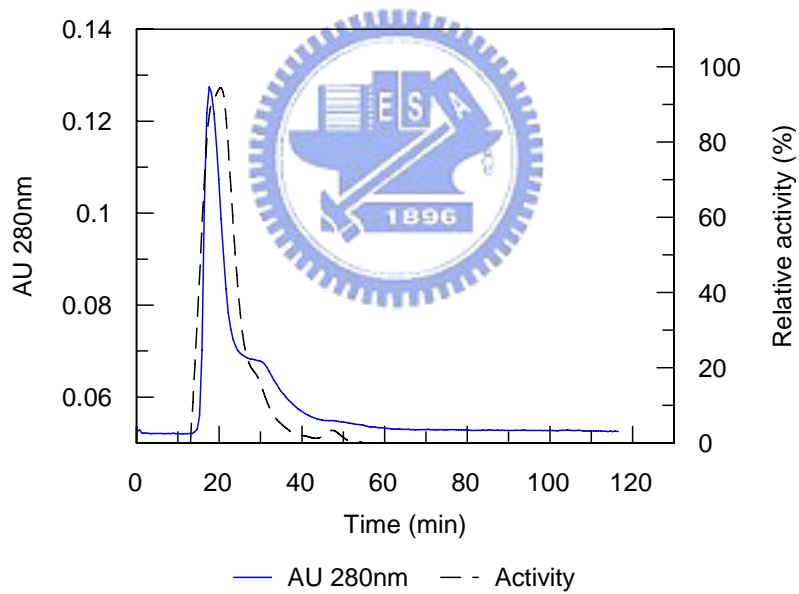


圖 3-4. G-75 (凝膠樹脂) 管柱層析圖

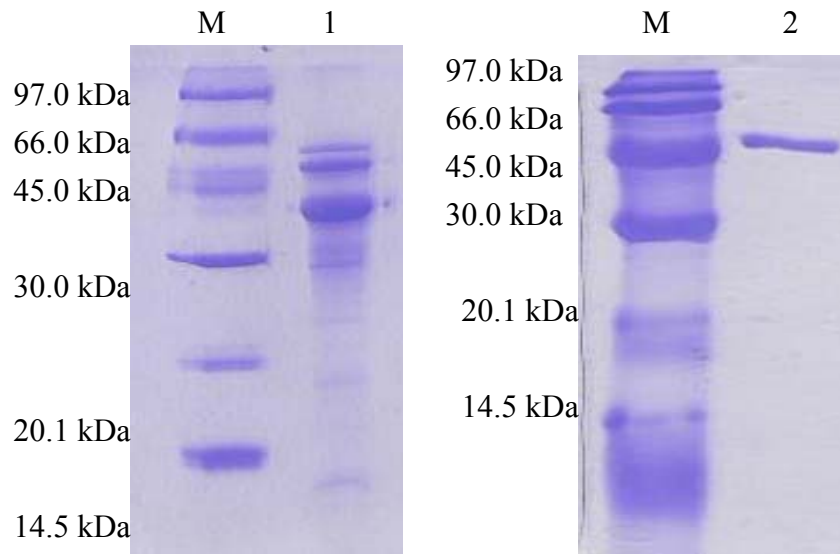


圖 3-5. Human α -L-fucosidase 純化之 SDS-PAGE 分析圖

Lane M : Protein marker

Lane 1 : 經過 SP 和 Q 管柱層析純化的 human α -L-fucosidase

Lane 2 : 經過 G-75 管柱層析純化的 human α -L-fucosidase

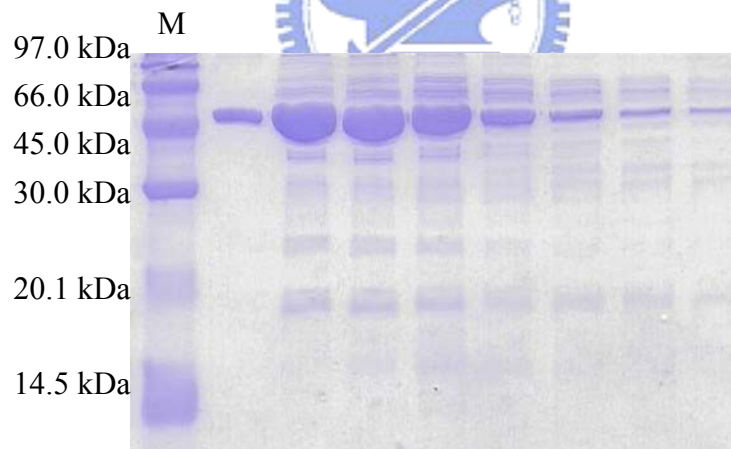


圖 3-6. 以 G-200 管柱純化 human α -L-fucosidase 之 SDS-PAGE 分析圖

Lane M 為 protein marker，其餘皆為純化後的蛋白質樣品

由 SDS-PAGE 分析，可以得知透過管柱層析取得的蛋白質分子量大約是 50 kDa 左右，這與基因序列所推算出的分子量相當吻合，而其最後純度估計大於 95% 均質度。

親和性管柱層析

早期人類 α -L-fucosidase的相關研究²⁶主要是由人體肝臟中萃取出蛋白質以進行研究，而純化的方式主要則是利用親和性管柱層析。親和性管柱層析可以有效的提高蛋白質的相對純度，是一個不錯的純化選擇；但是相較於一般常用的層析純化方式，親和性層析所使用的膠體較為昂貴，且需要有適用的ligand；因此相關欲應用於親和性層析的ligand必須先測試其與酵素的結合能力。

本實驗主要選擇 Fucosylamine 做為親和性 ligand，與膠體 (NHS activated) 偶合之後使用不同 pH 值的緩衝液流洗，最後使用醋酸鈉緩衝液(20 mM, pH 5.5) 平衡管柱，再將經過離子交換樹脂純化後的蛋白質粗提液注入。首先使用相同的緩衝液將無法與膠體進行親和性作用的蛋白質洗出，接著利用含 50 mM 岩藻糖緩衝液 (20 mM NaOAc, pH 5.5) 將 α -L-fucosidase 沖提出來。再使用含 250 mM 氯化鈉緩衝液 (20 mM NaOAc, pH 5.5) 將吸附在膠體上的蛋白質洗出。純化後的蛋白質樣品經過 SDS-PAGE 分析，其均質度大約可達 80%。

比較經過兩種層析方式的結果，可以得知一般的純化方式在純化 human α -L-fucosidase 重組酵素雖然較為複雜，但可以大量的進行純化工作，且均質度可達 95%；至於親和性管柱層析，不論是膠體或是沖提液都較一般純化方式昂貴，均質度雖可達 80%，卻不利於大量的純化酵素。但是基於 human α -L-fucosidase 失去活性之相關突變點酵素無法使用活性測試的方式進行追蹤，因此未來可能還是會利用親和性管柱層析將 human α -L-fucosidase 相關的突變點酵素進行純化，濃縮後再配合 G-75 凝膠樹脂管柱參與純化過程，相信有機會取得高均質度的突變點酵素，以利於更進一步的研究。

3-1-3 Human α -L-fucosidase 酵素的分子量

由圖 3-6 SDS-PAGE 分析中可以得知酵素的分子量約 50 kDa 左右，此值亦經過質譜測定分析後得到證實。從質譜圖中可以發現，蛋白質的主要分子量約為 50473 (圖 3-7) 與表 3-1 中 AFU 之理論推算值略有出入，可能是大腸桿菌在進行蛋白質表現時，將 N 端部份的前 3 個胺基酸切除。事實上，此等現象在本實驗室之其他研究中亦經常發現。

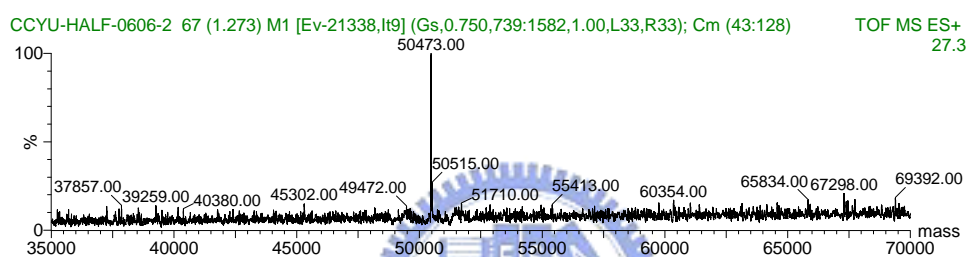


圖 3-7. 酵素分子量之質譜分析圖

表 3-1. 利用 Vector NTI 軟體分析酵素分子量

Analysis	Entire Protein
Length	439 aa
Molecular Weight	50877.55 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	6.13
Charge at pH 7	-5.09

3-2 酵素催化特性之研究

3-2-1 酸鹼值對酵素活性的影響

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 Na_2HPO_4 \Citric acid (100 mM, 50 mM NaCl, pH 3.5)、NaOAc (100 mM, 50 mM NaCl, pH 4.0、4.5、5.0、5.5)、MES (100 mM, 50 mM NaCl, pH 6.0)、 Na_2HPO_4 (100 mM, 50 mM NaCl, pH 6.5、7.0、7.5)；所使用的受質為 *p*-nitrophenyl- α -L-fucopyranoside (0.05 mM-2 mM)，反應總體積 150 微升，反應於 37 °C 在 3 分鐘內完成。將不同酸鹼值下所得到的反應初始速率以 Lineweaver-Burk method 作雙倒數圖 (double reciprocal plot)，如圖 3-8 所示，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) 操控，在許多酵素的研發中，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。岩藻醣苷水解酵素主要也是遵循此一特性進行反應，如 2002 年 Tarling C. A. 等人³⁷對來自於 *Thermotoga maritime* α -L-fucosidase 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；但是相較於此一細菌來源的 α -L-fucosidase，human α -L-fucosidase 其酸鹼值與酵素活性的關係非一單純的鐘型曲線分布 (圖 3-9)，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，重組的human α -L-fucosidase對PNPF的 K_m 為 0.105 mM， k_{cat} 為 48.6 sec⁻¹；相同條件下，由人體肝臟純化得到的human α -L-fucosidase²⁶的 K_m 為 0.43 mM

($0.26 \pm 0.03 \text{ mM}^{53}$), V_{\max} 為 $19.6 \text{ } \mu\text{mole/mg/min}$ (k_{cat} 約為 16.3 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。

關於這個特殊的現象，Alhadeff 等人²⁶ 早期人類肝臟 α -L-fucosidase 蛋白質萃取的相關研究中曾經有提出過；而我們所得到的酸鹼值與酵素活性的關係圖 (圖 3-10) 與人類肝臟 α -L-fucosidase 類似 (圖 3-11)。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⁵³，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-fucosidase 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 human α -L-fucosidase 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-fucosidase 的醣類移除後所得到的數據類似⁵³。

根據實驗中所取得的動力學數據與 Alhadeff 等人的研究結果^{26, 23} 比較，我們可以得知醣類修飾對 human α -L-fucosidase 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 human α -L-fucosidase 的醣類修飾，主要功能很有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。

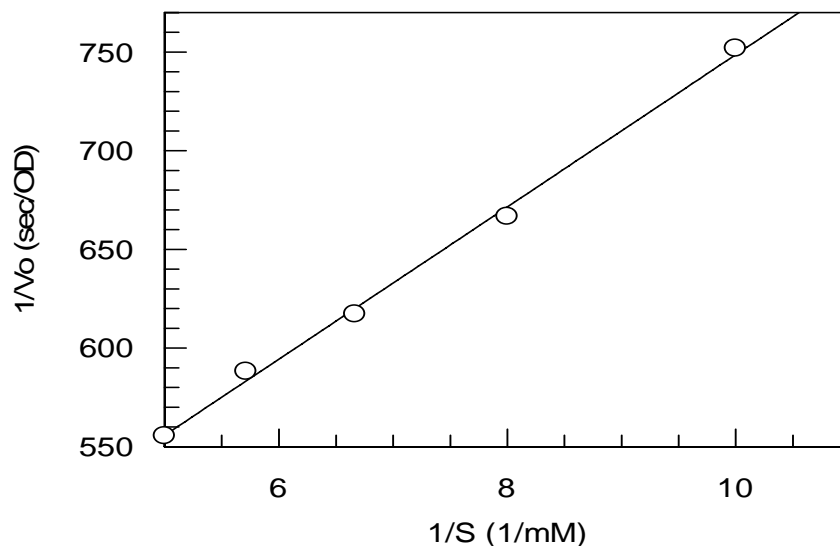


圖 3-8. 以雙倒數作圖法求解酵素對PNPF之 K_m 以及 k_{cat}

$$[E] = 0.93 \text{ } \mu\text{g/mL}, \text{ pH } 5.0, 37 \text{ } ^\circ\text{C}$$

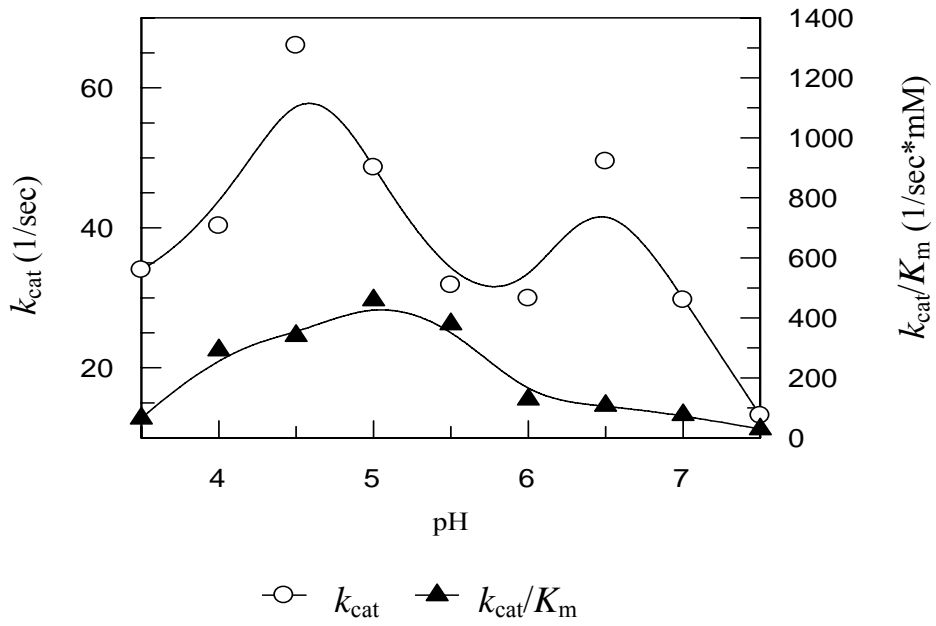


圖 3-9. pH profile of human α -L-fucosidase

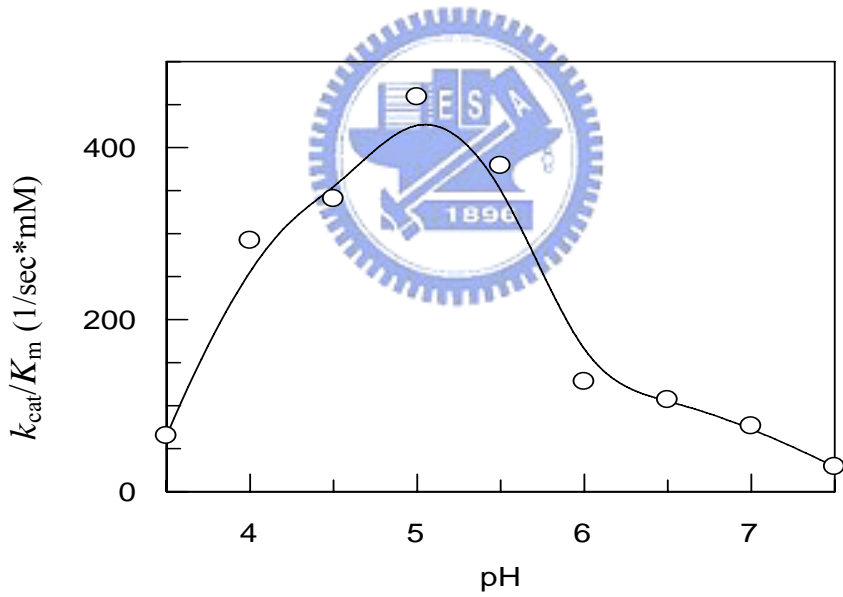


圖 3-10. Wild type human α -L-fucosidase 活性與 pH 值的關係

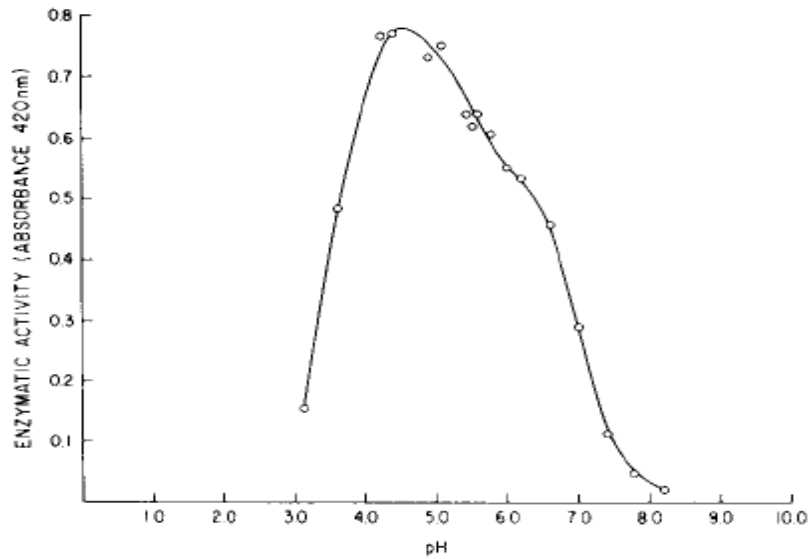


圖 3-11. Native human α -L-fucosidase 活性與 pH 值的關係
本圖為參考文獻 26 中節錄而得

3-2-2 催化速率決定步驟之探討

由早期人類肝臟³³以及細菌^{34, 37}之 α -L-fucosidase相關研究得知其催化反應為構型保留機制進行催化反應，其催化機制應為兩步驟雙取代反應，為了探討哪一個步驟是速率決定步驟，我們分析不同芳香族取代的 α -L-岩藻糖衍生物受質與 human α -L-fucosidase (AFU) 之反應，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。然而合成出芳香族 α -L-岩藻糖衍生物中， pK_a 較低的幾個受質如 2,4-dinitrophenyl- α -L-fucopyranoside、3,4-dinitrophenyl- α -L-fucopyranoside於緩衝液中會快速水解，無法適用於動力學的相關實驗；至於Phenyl- α -L-fucopyranoside，酵素則因反應性太差無法測定其動

力學數據。故透過動力學實驗只取得 3 組 pK_a 大於 7.0 受質的相關動力學數據。 k_{cat} 與速率決定步驟有關，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 -0.27 (圖 3-12)，初步推測芳香族離去基之強弱對整個催化反應影響可能不大。

若速率決定步驟為 glucosylation step，因其 β_{lg} 僅為 -0.27，故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，表示糖基與離去基鍵結之 C-O 鍵只有少許之斷裂，亦即其過渡狀態為 early-transition state，其反應物過渡態應與起始反應物相似，因此若使用 Phenyl- α -L-fucopyranosid 當成此酵素之抑制劑，同時與 PNPF 及酵素反應，應該會有較強烈的抑制能力；但實驗得知其 K_i 值僅為 3 mM ($\Delta G^0 \sim 3.59$ kcal/mole)，其抑制之能力並不明顯，這與上述之推論 (速率決定步驟為 glucosylation step) 不相符；當高濃度的酵素與 PNPF 作用時，可觀測到 initial burst 的現象 (圖 3-13)，而 Alhadef 等人也曾觀察到這個現象³³，此等現象最可能的原因是酵素與 PNPF 作用時快速進行第一步驟 (glycosylation step) 而產生 glycosyl-enzyme 中間體累積的現象。因此我們推測其反應速率決定步驟應該是 deglycosylation step 而非 glucosylation step。

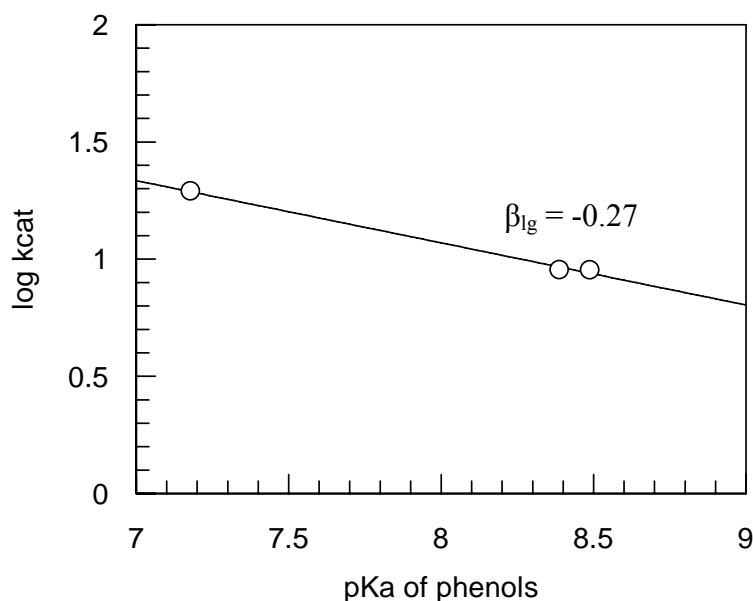


圖 3-12. Brønsted plot $\log k_{cat}$ 對受質離去基 pK_a 作圖
[E] = 1.23 μ g/mL, pH 6.8, 37 $^{\circ}$ C

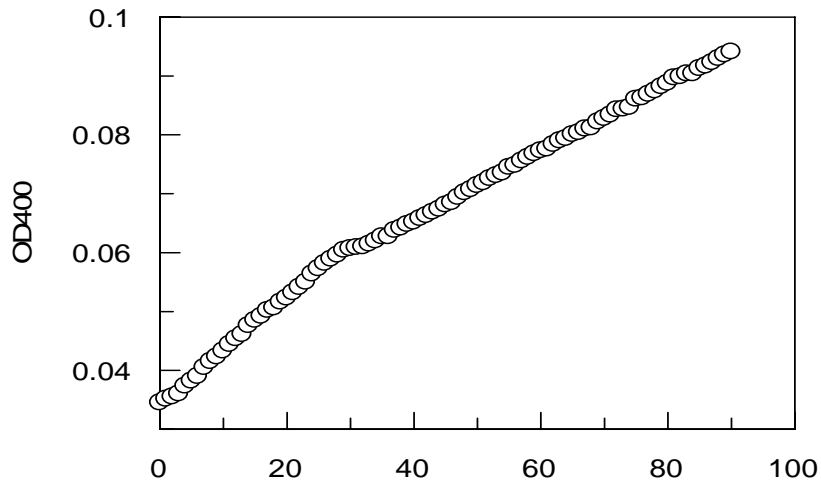


圖 3-13. Initial burst

[E] = 2.46 $\mu\text{g/mL}$, [S] = 0.05 mM PNPF, pH 7.0, 37 $^{\circ}\text{C}$

3-2-3 Fuconolactone 抑制作用測定

一般醣類水解酵素之催化會經由一 oxocarbenium ion 過渡態而完成反應，因此其相對應之醣類內酯 (glyconolactone) 如圖 3-43 所示，均為相當好的抑制劑，其抑制常數在 micromolar-nanomolar 之間，為進一步了解本酵素之催化機制，我們合成了 Fuconolactone 並研究其抑制作用。

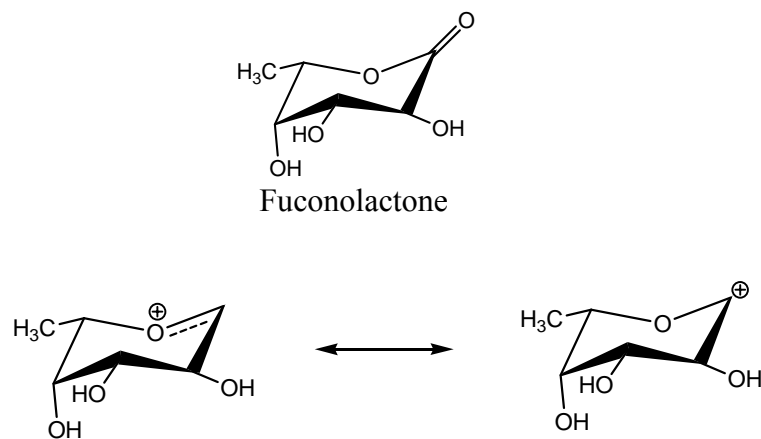


圖 3-14. Fuconolactone 以及酵素催化水解反應可能的過渡態結構

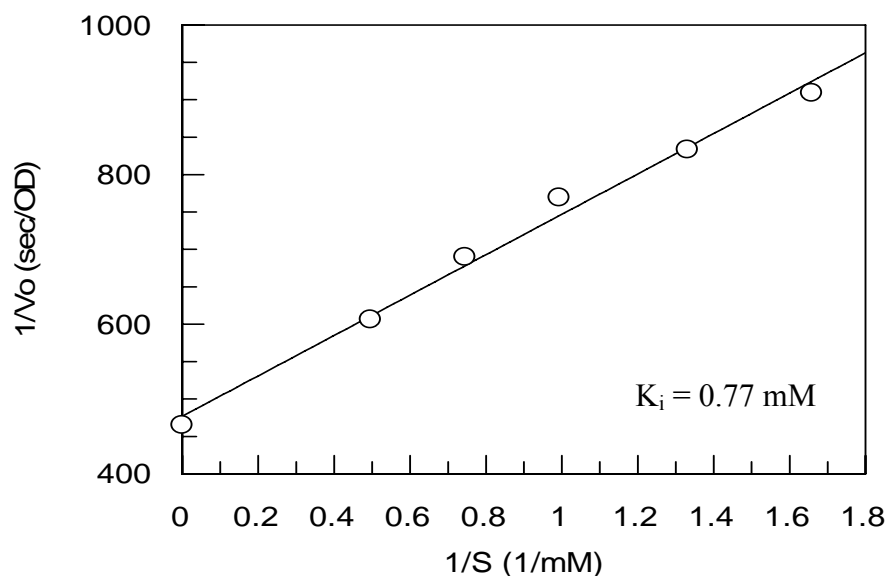


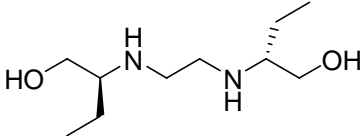
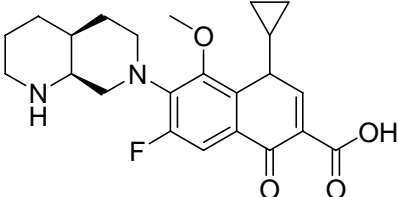
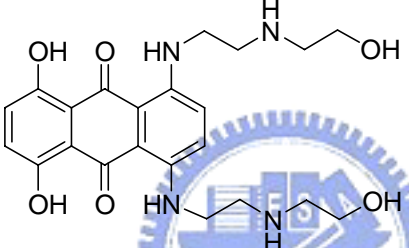
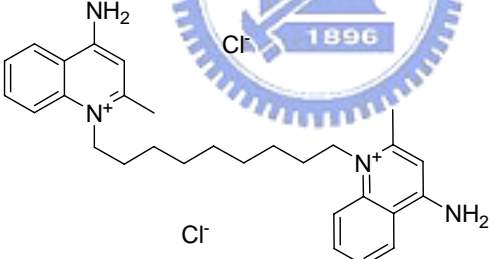
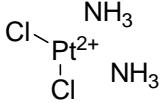
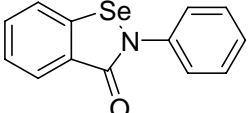
圖 3-15. Human α -L-fucosidase 對 Fuconolactone 抑制常數圖
 [E] = 1.23 μ g/ml, pH 7.0, 37 $^{\circ}$ C

但是在我們的研究中，Fuconolactone 的抑制能力不如預期的強烈，抑制常數約 0.77 mM 左右，其與 human α -L-fucosidase 之結合能力約與 Fucose（催化反應之產物）相當；因此推測催化反應進行時的過渡態結構可能並非 oxocarbenium ion。另外，透過同位素二級效應（secondary deuterium kinetic isotope effect）的相關研究，我們可以進一步了解酵素催化反應過渡態的真實結構情形。

3-3 藥物篩選

抑制劑的研究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；將藥物庫利用 ELISA reader 進行抑制劑篩選是一個快速且簡單的方法。本研究針對超過 300 種藥物進行篩選（參考附錄二），我們很幸運的篩選到幾種非岩藻醣類似物的小分子抑制劑。表 3-2 為控制藥物濃度 100 μ M 進行初步篩選所得 6 個具有明顯抑制效果藥物的結構。

表 3-2. 具有抑制效果的藥物（其他相關藥物資料請參考附錄二）

No	Structure	Compound Name
12G10		Ethambutol
24A09		Moxifloxacin
19F09		Mitoxantrone
1H07		Dequalinium chloride
19C06		Cisplatin
24C10		Ebselen

3-4 有效抑制劑衍生物的測試與合成

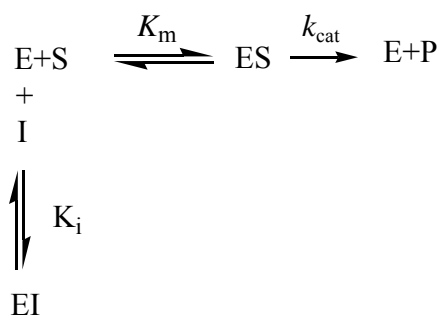
3-4-1 抑制劑之類型分析與專一性之探討

抑制作用的研究可有效模擬酵素與受質之間的結合作用，更是探討酵素催化機制的重要方式之一。一般來說，抑制劑可分為兩大類：一種為可逆抑制劑 (reversible inhibitors)，另一種則是不可逆抑制劑 (irreversible inhibitors)。利用不可逆抑制劑直接與酵素活性位置作用，可以鑑定出哪一個胺基酸殘基是直接或間接扮演重要的反應催化角色。而利用可逆抑制劑可了解酵素活性區的特性以及催化反應機制。

可逆型的抑制劑 (reversible inhibitors) 有以下數種形式，其中有競爭型 (competitive)、無競爭型 (noncompetitive) 以及非競爭型 (uncompetitive)。

1. 競爭型抑制劑 (competitive inhibitors)：

抑制劑本身的分子結構與受質分子類似，兩者會同時競爭進出酵素分子的活性區，競爭型抑制劑的抑制程度與受質濃度和抑制劑本身的濃度有關。抑制的效果會隨著受質濃度的提高而減弱。這是因為受質濃度提高後會增加酵素受質複合體 (enzyme-substrate complex) 的濃度，降低抑制劑與酵素反應的可能，如下列的反應式表示：



其反應速率可寫成下式：

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

其中[I]：抑制劑的濃度， K_i ：抑制常數 (Enzyme-inhibitor complex dissociation constant)

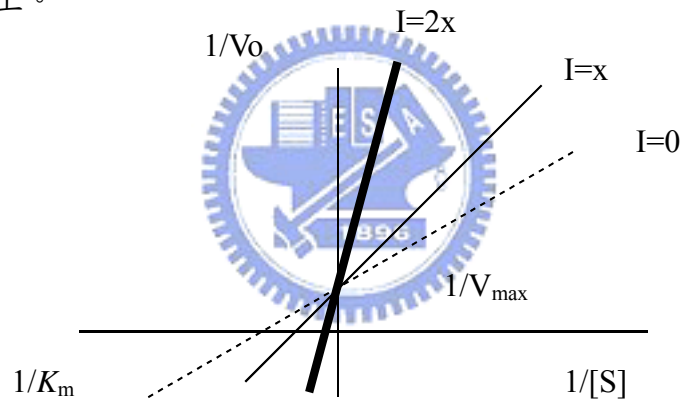
由上式可知，若 V_{\max} 不變而 K_m 變大，即為競爭型抑制劑。

若對兩邊取雙倒數，即可將上式轉變為

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

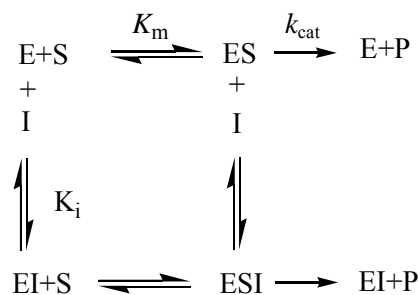
利用 $1/V$ 對 $1/[S]$ 作圖，則斜率為 $\frac{K_m[1+[I]/K_i]}{V_{\max}}$ ，截距為 $\frac{1}{V_{\max}}$

因此在雙倒數作圖中，不同濃度的競爭型抑制劑會具有相同的截距並於交於 Y 軸的同一點上。



2. 無競爭型抑制劑 (noncompetitive inhibitors) :

與酵素分子的活性區以外的其他區域進行結合，結合之後會促使酵素的結構產生改變使其不能與受質進行結合。由於這一類型的抑制劑與受質的結合位置並不相同，增加受質的濃度不會影響抑制劑的抑制能力，如下式所示：



反應速率表示方式如下：

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

其中[I]:抑制劑的濃度, K_i :抑制常數(Enzyme-inhibitor complex dissociation constant)

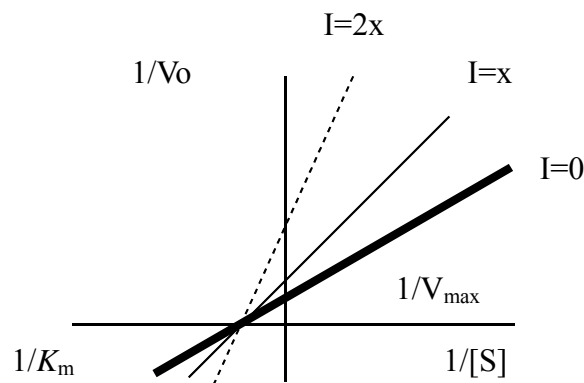
對兩邊取雙倒數後得

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

設 $1 + \frac{[I]}{K_i} = \alpha$, 則

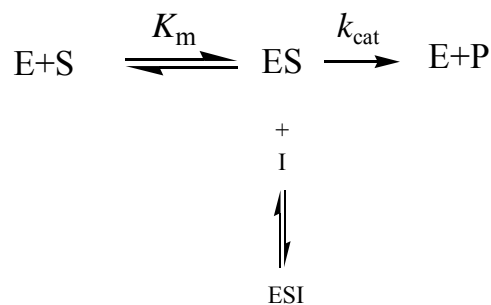
$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{\alpha V_{\max}}$$

當[I]增加時, V_{\max}/α 減少, 而 α/V_{\max} 增加, 因此非競爭型抑制劑會改變 V_{\max} , 相對的 K_m 則不會變動。因此在雙倒數作圖中, 不同濃度的無競爭型抑制劑會交於X軸上的同一點 $-1/K_m$, 而截距則是隨著抑制劑的濃度改變。



3. 非競爭型抑制劑 (uncompetitive inhibitor)

當酵素與受質作用之後, 酵素的結構改變產生了能夠與抑制劑作用的位置, 如下式所示:



反應速率表示方式如下：

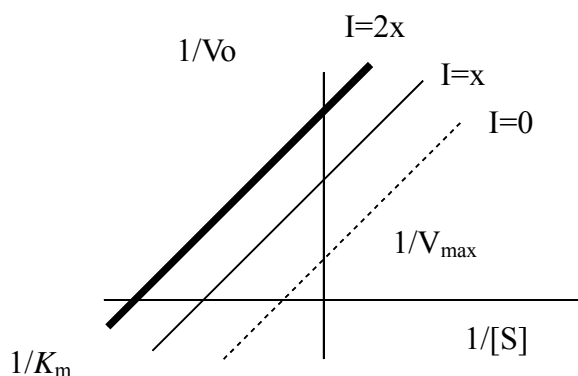
$$V = \frac{V_{\max}[S]}{1 + [I]/K_i} \cdot \frac{K_m}{K_m + [S]}$$

其中 [I]：抑制劑的濃度， K_i ：抑制常數 (Enzyme-inhibitor complex dissociation constant)

對兩邊取雙倒數後得

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

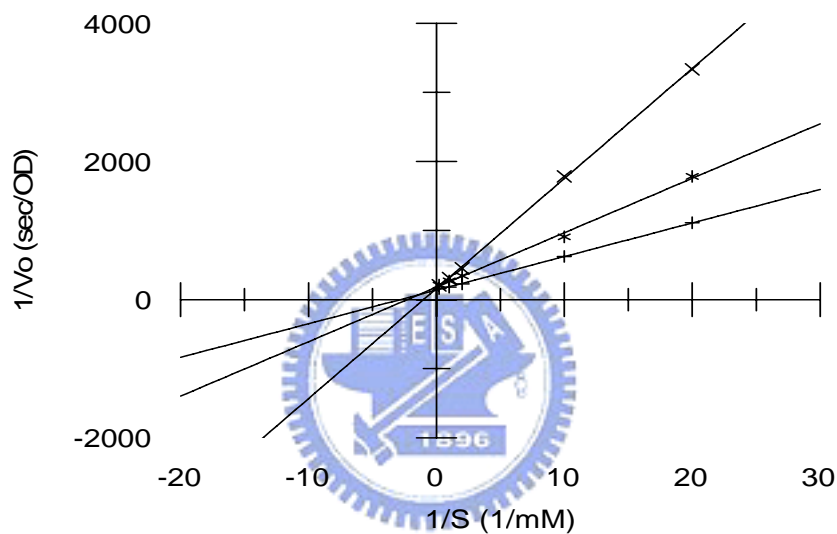
當斜率固定時，當 [I] 增加時，則 K_m 、 V_{\max} 皆變小。因此在雙倒數作圖中，不同濃度的非競爭型抑制劑結果為平行線，這些線在圖形上不會有任何交點。



本實驗主要針對每個從藥物資料庫所篩選出的抑制劑進行分析，鑑定其抑制模式。

可逆抑制劑抑制類型的測定

Ethambutol 是目前為治療肺結核的第一線藥物之一，其主要功能為抑制細菌的細胞壁合成；從圖 3-16 中可以看出三條線約相交於 Y 軸上，應是屬於競爭型的抑制作用。由於 Ethambutol 為一長鏈結構，可能是因為摺疊之後其構型與 Fuconojirimycin 類似，因此有較佳的親和性可與受質競爭進入 human α -L-fucosidase 的催化位置。

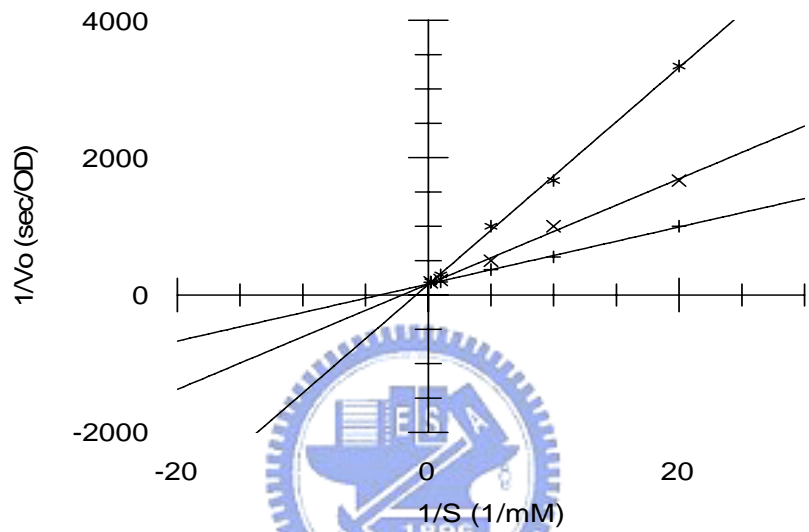


Ethambutol concentration +: 0 μ M, *: 2 μ M, x: 10 μ M

圖 3-16. 競爭型抑制劑-Ethambutol

[E] = 0.16 μ g/mL, pH 7.0, 25 $^{\circ}$ C

Mitoxantrone 主要應用於癌症的治療，主要是透過與 DNA 形成 crosslink 阻止癌細胞生長；從圖 3-17 中可以看出三條線相交於 Y 軸上，應屬於競爭型的抑制作用。Mitoxantrone 是由三個相連在一起的苯環構成其基本結構，但這個結構可能非產生抑制效果的主體；其與 human α -L-fucosidase 作用的可能是三環外延伸出的兩長鏈結構，此長鏈結構與 Ethambutol 類似。

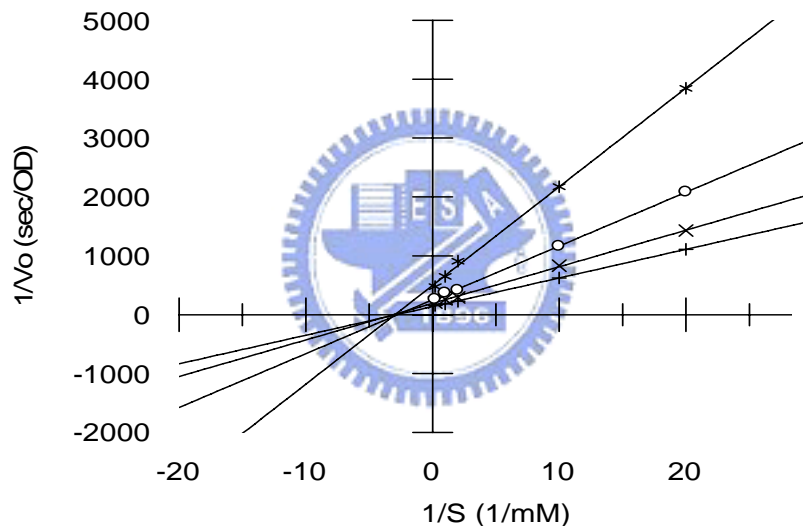


Mitoxantrone concentration + : 0 μ M, x : 5 μ M, * : 10 μ M

圖 3-17. 競爭型抑制劑-Mitoxantrone

[E] = 0.16 μ g/mL , pH 7.0, 25 $^{\circ}$ C

另一可逆抑制劑為 Dequalinium chloride，從圖 3-18 中可以看出三條線相交於 X 軸上，屬於無競爭型的抑制作用。從結構來看，Dequalinium Chloride 與之前的幾個抑制劑的結構上有很大的差別，推測其主要與蛋白質作用的主體結構為兩側的雙環結構；雙環結構與蛋白質作用的位置並不是酵素的催化位置而是其他的位置，由於 Dequalinium chloride 在緩衝液中帶正電，推測其會與蛋白質某些帶有較多負電的區域作用進而使得結構產生扭曲，而結構扭曲之後可能使得催化位置的環境改變進而喪失催化反應的能力。於此抑制劑作用的方式可能屬於正負電的作用誘使蛋白質的結構產生變化，因此推測其抑制效果的專一性會比較低。



Dequalinium chloride concentration +: 0 μM , x: 5 μM , o: 25 μM , *: 50 μM

圖 3-18. 無競爭型抑制劑-Dequalinium chloride

[E] = 0.16 $\mu\text{g/mL}$, pH 7.0, 25 $^{\circ}\text{C}$

3-4-2 抑制劑對不同酵素專一性測試

專一性是判斷一個藥物良好與否的重要指標之一。從藥物庫篩選出來的非醣類抑制劑由於其立體結構較為簡單，可能會影響對酵素抑制作用的專一性；透過這個實驗，我們可以了解到所篩選出來的幾個抑制劑對 α -L-fucosidase 的專一性程度。

表 3-3. 抑制劑專一性的比較

	No-inhibitor	Dequalinium chloride	Ethambutol
α -L-arabinofuranosidase	100%	110%	100%
α -glucosidase	100%	63%	105%
β -glucosidase	100%	84%	108%

* 反應條件請參閱實驗方法

由上表得知，Ethambutol 具有極佳的專一性；不會與其他表 3-4 中的醣類水解酵素產生作用，主因可能是 Ethambutol 對 α -L-fucosidase 來說是屬於競爭型的抑制劑，其構型能夠與其催化位置產生良好的親和作用。至於 Dequalinium chloride 則多少會對其他酵素的活性產生影響，這個現象很有可能是因為 Dequalinium chloride 非進入酵素的催化位置與其中的胺基酸進行作用，而是透過正負電作用改變蛋白質的結構進而影響其催化反應的活性，此種抑制的方式只需尋找活性區外的負電區進行作用不須辨識酵素的活性區，可能因為這個原因減低了該抑制劑的專一性。

3-4-3 抑制劑對不同來源的岩藻醣苷水解酶專一性測試

不同來源的岩藻醣苷水解酵素雖然都具有水解岩藻醣苷鍵的功能，但是他們之間胺基酸序列的差異性可能會使得活性區的性質有很大的不同，因此會影響抑制劑的選擇性；透過這個實驗我們可以比較這些小分子抑制劑對於不同來源的 α -L-fucosidase 是否具有不同的專一性。

表 3-4. 比較 Ethambutol 對 4 種不同來源 α -L-fucosidase 的抑制效果

Source	Activity without Ethambutol	Activity with 10 μ M Ethambutol
Human liver	100%	30%
<i>Thermotoga maritima</i>	100%	92%
Bovine kidney	100%	67%
<i>Corynebacterium sp.</i>	100%	85%

*反應條件請參考實驗方法

由上表得知，Ethambutol 對不同來源的 α -L-fucosidase 具有不錯的專一性，相對活性具有很大的差別。Ethambutol 對哺乳類動物的 α -L-fucosidase 似乎具有比較好的抑制效果，這很有可能是哺乳類動物之間的胺基酸序列相似度較高，因此其反應活性區的結構較為類似所造成。

3-4-4 可逆抑制劑抑制常數的測定

根據表 3-5 的結果，分別測定 Human 以及 *Thermotoga maritima* 這兩個不同來源的 α -L-fucosidase 對 Ethambutol 的抑制常數。我們已知 Ethambutol 為競爭型的抑制劑，其反應速率為

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

其中 [I]：抑制劑的濃度， K_i ：抑制常數 (Enzyme-inhibitor complex dissociation constant)

若對兩邊取雙倒數，即可將上式轉變為

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

利用 $1/V$ 對 [I] 作圖，固定受質的濃度，則斜率為

$$\frac{K_m/K_i}{V_{\max}[S]}$$

為 $\frac{K_m + [S]}{V_{\max}[S]}$ 。

由於 V_{\max} 以及 K_m 已知，即可帶入公式中求得抑制常數 K_i 值。

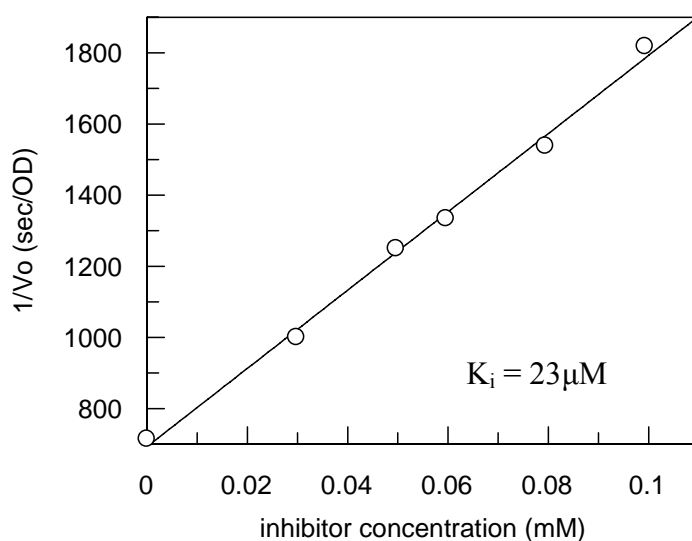


圖 3-19. Human α -L-fucosidase 對 Ethambutol 抑制常數圖
[E] = 1.23 μ g/mL, pH 7.0, 37 $^{\circ}$ C

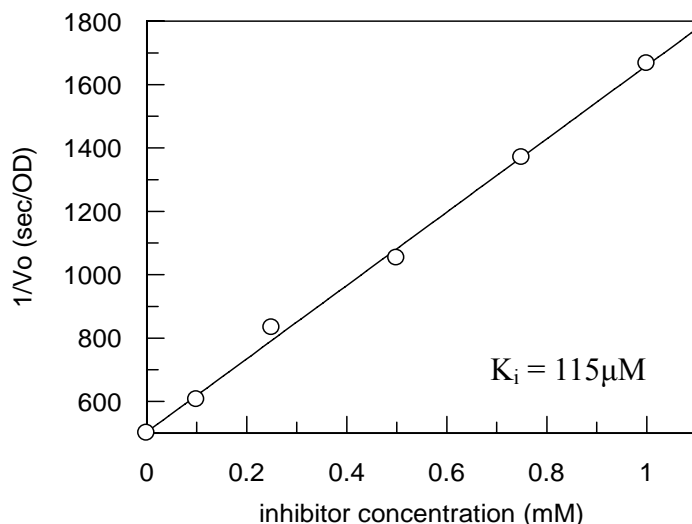
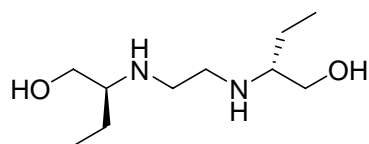


圖 3-20. *Thermotoga maritime* α -L-fucosidase 對 Ethambutol 抑制常數圖
[E] = 23 μ g/mL, pH 7.0, 37 $^{\circ}$ C

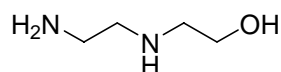
由圖 3-19 及 3-20 得知，Ethambutol 對於 Human 來源的 α -L-fucosidase 具有較佳的抑制效果， K_i 值相差約為 5 倍左右；這個結果與 Ho 等人^{82,83} 所設計的抑制劑比較之後，顯示 Human 和細菌來源的 α -L-fucosidase 其催化活性區域具有差異。而進一步結構上的資料必須待蛋白質晶體結構的取得將可以釐清。

3-4-5 Ethambutol 相關類型藥品及衍生物抑制研究

Ethambutol (圖 3-21) 為一具有對稱結構的雙醇化合物，於初步的篩選結果中具有不錯的抑制能力以及專一性，其結構中的兩個醇基對於抑制能力有決定性的影響；若將其中一端的結構移除，這個結構即為 2-(2-aminoethylamino) ethanol (圖 3-21) 的結構，完全沒有任何的抑制能力；若是將其中一端的醇基改成其他的取代基，抑制效果亦是完全喪失。此外，若於長鏈中的氮原子進行加成反應接上一長鏈分子，也會使抑制能力大幅度的下降。因此我們推測，長鏈上的兩個氮原子以及兩個醇基是這個抑制劑的重要結構 (相關藥品結構請參考附錄二中 1A04, 1D05, 6C08, 13H02 及 C1-C6 等)。



Ethambutol



2-(2-aminoethylamino) Ethanol

圖 3-21. Ethambutol 相關類型結構

經過初步的測試，Ethambutol 結構上的任何更動幾乎都會使其抑制能力降低。因此將具有抑制效果的藥物結構整理比較後，設計了其他幾種相關衍生物(表 3-5)。

表 3-5. 2-(2-aminoethylamino) ethanol 相關衍生物抑制性比較

No	Structure	Compound Name	IC ₅₀
1		1,3-bis(2-(2-hydroxyethylamino)ethylamino)propan-2-one	~14mM
2		1,3-bis(2-(2-hydroxyethylamino)ethyl)urea	~8mM
3		tert-butyl-3-hydroxy-1-(2-(2-hydroxyethylamino)ethylamino)-1-oxopropan-2-ylcarbamate	~2mM

由表 3-5 得知，第一個和第二個從結構上所設計出的化合物對 human α -L-fucosidase 的抑制能力沒有達到預期的結果；若又重新檢視相關篩選出的抑制劑之間的結構差異性，如圖 3-22 所示，我們發現另一個影響抑制能力的官能基

可能是在遠端的OH基。基於這個推測設計了化合物 3 進行測試，而化合物 3 從實驗結果中可以得知抑制效果較其他幾個藥品都來的強， IC_{50} 約為化合物的 25%，化合物 3 可能有機會應用於親和性層析純化human α -L-fucosidase。

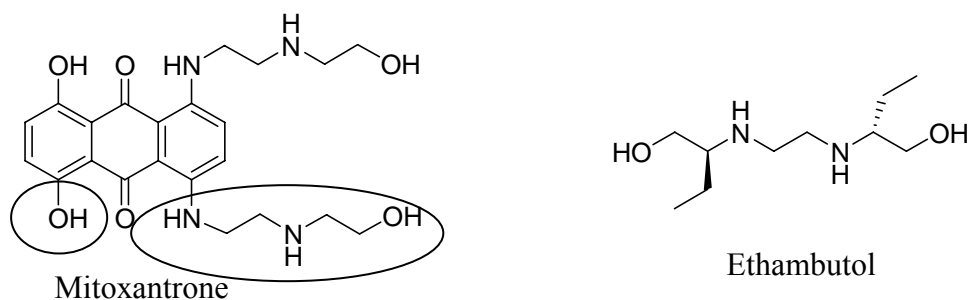


圖 3-22. Mitoxantrone 以及 Ethambutol 結構比較

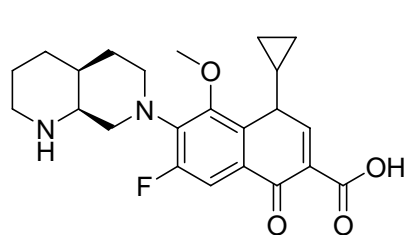
這一部份藥物篩選的研究中，Ethambutol的主體結構是大部分所篩選出具有抑制效果藥物的基本結構，若將此一結構與 α -L-fucosidase 的強力抑制劑 Fuconojirimycin的結構比較，我們可以發現兩者的結構上有某些程度的類似。因此推測，Ethambutol與酵素作用的方式可能會與Fuconojirimycin類似；另外，由於Ethambutol上有兩個二級胺，它們的質子化情形可能也會對其抑制能力產生影響；若是以Ethambutol作為抑制劑，改變緩衝液pH值與酵素進行抑制作用的測定，有機會判斷出Ethambutol以及酵素質子化的程度對於抑制作用的影響。

3-4-6 有效抑制劑結構分析與討論

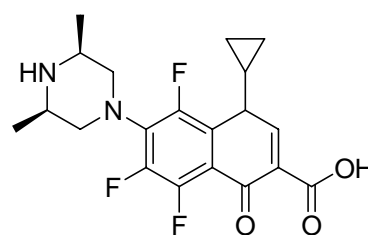
在進行藥物篩選的過程中，我們根據初步篩選的結果，從藥物庫中取出各種結構相近的其他藥品進行抑制能力的測試，藥品濃度一律控制在100 μM ，比較酵素作用時的初始速度，判斷此藥物的抑制能力。根據實驗中幾個具有抑制能力藥物的結構，除了Ethambutol相關類型之外，以下將分成四種不同的結構進行討論。

A. Moxifloxacin相關類型

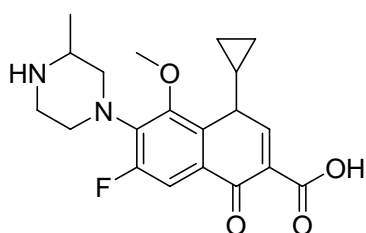
Moxifloxacin (圖3-23) 具有兩組雙環的結構，其抑制的效果並不是十分的強烈；但是有趣的是，另外從藥物庫中取得的相關類似物 Orbifloxacin及 Gatifloxacin (圖3-23) 則完全沒有任何抑制的效果。比較這三個類似的藥物之後，我們可以發現，真正具有抑制效果的結構，是 Moxifloxacin上面帶有氮原子的雙環結構；這個結構類似於 Ethambutol的主鏈結構，而遠端的氟原子可能扮演醇基的角色。



Moxifloxacin



Orbifloxacin



Gatifloxacin

圖 3-23. Moxifloxacin 相關類型結構

B. Mitoxatrone 相關類型

Mitoxatrone (圖 3-24) 主要結構為一具有三環結構為主體的化合物，其抑制能力也不差。這一類的類似構型的藥物於藥物庫中還有其他兩個，分別是 Pyrromycin 及 Bisanhydrorutillantione (圖 3-24)；除了 Mitoxatrone 外，另外兩者並不具有抑制的效果。比較它們的結構之後可以得知，三環結構並非是產生抑制能力的重要結構，真正影響抑制能力的結構應該是三環上的兩個長鏈；而很巧的是，這個長鏈結構與 Ethambutol 的主鏈結構非常的類似。

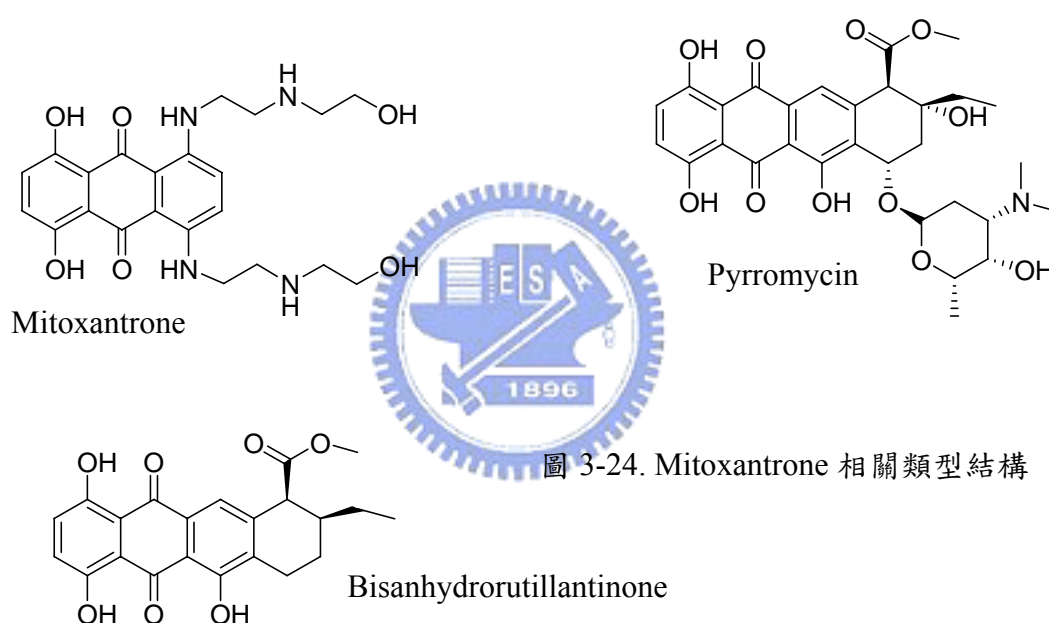
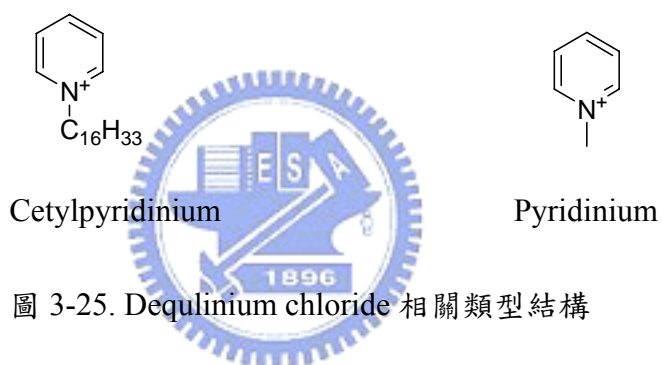
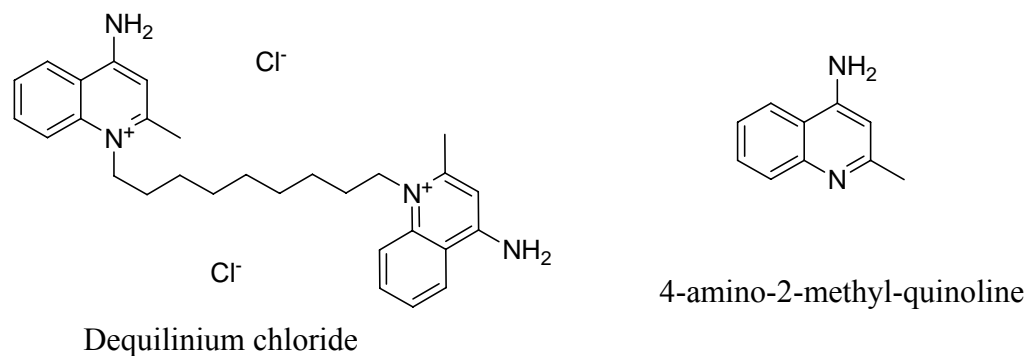


圖 3-24. Mitoxatrone 相關類型結構

D. Dequalinium chloride 相關類型

Dequalinium chloride (圖 3-25) 為一長鏈帶有兩端雙環結構，雙環上各有一個帶正電的氮原子。若取其不帶電的雙環結構 4-amino-2-methyl-quinolin (圖 3-25) 進行抑制測試，發現其幾乎沒有任何的抑制效果。因此我們推測雙環系統中所攜帶的四級銨離子對於抑制能力具有決定性的影響。另外，本系列中 Cetylpyridinium (圖 3-25) 亦具有很強的抑制效果，但若將長鏈縮短之後 (圖 3-25) 則完全沒有抑制的效果；若以 Cetylpyridinium 進行抑制能力分析，當加

入某特定濃度之後，酵素活性會完全喪失，因此我們推測這個藥品很有可能是 Detergent 而非抑制劑。



E. 金屬及其他原子化合物相關結構

這一類的抑制劑有三個，分別是 Phenylmercuric acetate、Cisplatin 以及 Ebselen。Phenylmercuric acetate 可能是透過汞與蛋白質的硫氫基形成共價鍵結進而抑制酵素的活性；至於其他兩個化合物（圖 3-26）如何與酵素作用，將於後續章節中探討。

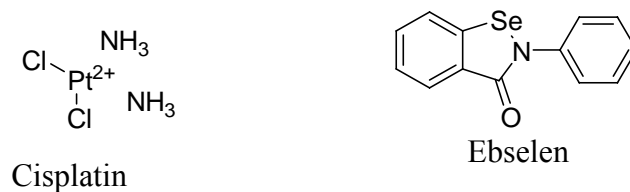


圖 3-26. Cisplatin 及 Ebselen 的結構

3-4-7 不可逆抑制劑的測定

藥物篩選得到 3 個可能屬於不可逆的抑制劑，其一為Phenylmercuric acetate。早期的相關研究曾經指出^{40,41}，汞的化合物會抑制哺乳類動物 α -L-fucosidase，一般推測是由於汞的化合物會與胺基酸中的半胱胺酸（cysteine）形成共價鍵結而產生的影響，但此共價鍵結非標定於水解反應的必要胺基酸之上⁴¹，因此Grove等人⁴⁰曾推測哺乳類動物 α -L-fucosidase中可能有幾個帶有硫氫基且位於活性區外的胺基酸對於整個蛋白質結構維持扮演很重要的角色。

另一個不可逆抑制劑則是Cisplatin。Cisplatin是治療生殖細胞腫瘤的藥物，它的作用方式和汞的化合物類似，於有水的環境中會先形成水的加成物（圖 3-27）⁸⁹，接著會和胺基酸中的半胱胺酸(cysteine)反應形成共價鍵結。我們亦將Cisplatin與human α -L-fucosidase混合進行時序（time course）偵測其活性變化（圖 3-28），結果發現，隨著作用時間延長，human α -L-fucosidase之催化活性逐漸下降，顯示Cisplatin為一不可逆之抑制劑。

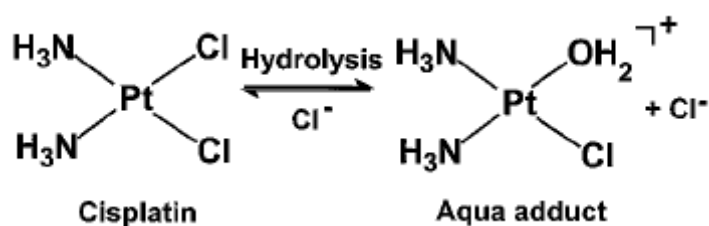


圖 3-27. Cisplatin 水的加成

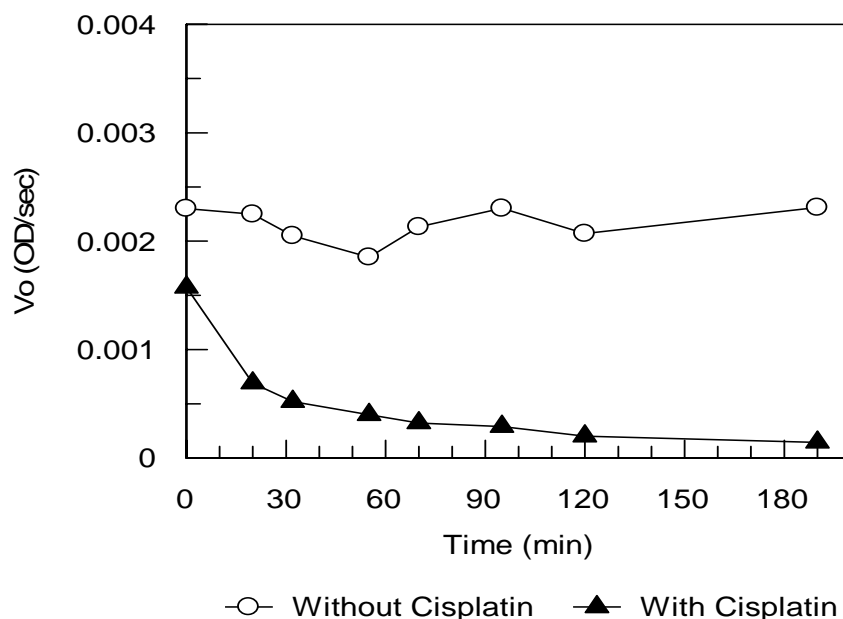


圖 3-28. 不可逆抑制劑 Cisplatin

[E] = 0.16 $\mu\text{g}/\text{mL}$, pH 7.0, 25 $^{\circ}\text{C}$

根據蛋白質序列^{*}，我們得知human α -L-fucosidase胺基酸序列中共有 5 個半胱胺酸，而這其中可能有幾個會形成雙硫鍵以維持蛋白質的結構，而未形成雙硫鍵的半胱胺酸對活性會有如此大的影響卻是非常特別。

另一不可逆的抑制劑為 Ebselen。Ebselen 在抗發炎的治療具有很好的效果，它本身即是一個優良的抗氧化劑。與蛋白質的作用方式與汞的化合物及 Cisplatin 類似；比較不同的是，汞的化合物及 Cisplatin 與半胱胺酸鍵結之後就不會再進行更進一步的反應，但 Ebselen 與半胱胺酸反應形成 Ebselen selenenylsulphide，Ebselen selenenylsulphide 會進一步與其它的半胱胺酸反應，最後形成雙硫鍵，而 Ebselen selenenylsulphide 則會轉變為 Ebselen selenol（圖 3-29）。在本實驗中，Ebselen 亦有可能僅與半胱胺酸進行共價鍵標示（label）而破壞了 human α -L-fucosidase 之活性，詳細情形我們將進一步以質譜技術研究之。

*相關序列比對請參考附錄三

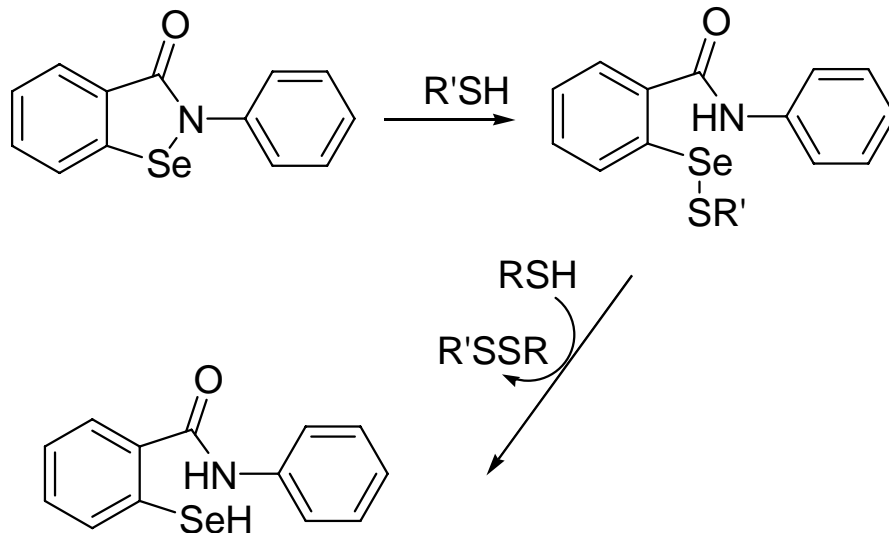


圖 3-29. Ebselen 與蛋白質反應圖

根據這三個不可逆抑制劑的發現，我們可以預測，半胱胺酸對 human α -L-fucosidase 活性的維持具有很重要的地位。未來的實驗中，可能會利用 Cisplatin 或是 Ebselen 標定並結合 Peptide mapping 的技術找出這個特定的胺基酸，若能再與蛋白質晶體結構一起配合，將可以有助於了解半胱胺酸在 α -L-fucosidase 中對結構的影響。

3-5 未來研究方向

由於 human α -L-fucosidase 的活性必要胺基酸位置、晶體結構仍未被解出，這方面的工作仍待實驗室的後續努力加已完成。

另外，酸鹼值對 human α -L-fucosidase 活性的影響極為特殊，必須設計其他的相關實驗並配合未來解出的蛋白質晶體結構加以分析，以了解此依特殊的機制。