

第四章 結論

1. 將不含 signal peptide 的 human α -L-fucosidase 基因建立在 pET22b 上，利用大腸桿菌 BL21 (DE3) 表現。透過管柱層析後可取得均質度達 95% 的 human α -L-fucosidase，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 α -L-fucosidase 的一套流程。
2. 以 PNPf 為反應基質在 pH 5.0 的環境下進行活性分析，其 K_m 以及 k_{cat} 分別為 0.105 mM 和 48.6 s^{-1} 。相較文獻中²⁶人類肝臟萃取的 α -L-fucosidase ($K_m = 0.43 \text{ mM}$, $V_{max} = 19.6 \text{ } \mu\text{mole/mg/min}$ 相當於 $k_{cat} = 16.3 \text{ sec}^{-1}$)，重組酵素的催化能力 (k_{cat}/K_m) 約為肝臟原生酵素的 12 倍。
3. 根據 pH profile，重組 human α -L-fucosidase 存在兩活性最佳區域，分別是 pH 4.5 以及 pH 6.5。另外，不具任何醣類修飾的重組 human α -L-fucosidase 的反應曲線會稍微的往高 pH 值的區域偏移，這與早期的研究 Alhadeff 等人的研究結果^{26, 53} 相符。
4. 醣類修飾對 human α -L-fucosidase 結構的影響可能不大，酵素催化能力沒有巨大的改變；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運作。
5. 以離去基大於 pKa 大於 7.0 為基質建立 Brønsted plot，其 β_{lg} 值約為 -0.27；酵素進行催化反應時也觀測到 initial burst 現象；phenyl- α -L-fucopyranoside 並非強力的抑制劑顯示 early transition-state 的推論不能成立。因此推測其催化作用之速率決定步驟應為去醣基 (deglycosylation) 步驟。
6. 由藥物庫篩選得到幾個抑制劑；分別為不可逆抑制劑 Cisplatin、Ebselen；競爭型抑制劑 Ethambutol、Mitoxantrone；非競爭型抑制劑 Dequalinium chloride。而 Ethambutol 之結構可能為本次藥物篩選中最重要的基本結構。
7. Ethambutol 為一競爭型抑制劑對 human α -L-fucosidase 的 K_i 為 23 μM ；對

Thermotoga maritime α -L-fucosidase的 K_i 則為 115 μ M。這個結果顯示不同來源的 α -L-fucosidase其催化活性區域結構不盡相同。

