

# 人類岩藻醣苷水解酶之抑制研究

研究生：陳朝勝

指導教授：李耀坤 博士

國立交通大學應用化學所碩士班

## 摘 要

人類岩藻醣苷水解酶 (Human  $\alpha$ -L-fucosidase, AFU) 屬於醣類水解酵素第 29 家族的水解酶 (EC 3.2.1.51)，本研究著重於該酵素的相關催化功能與抑制作用的探討。

將建構在 pET22b 上的 Human  $\alpha$ -L-fucosidase 基因轉殖進入大腸桿菌 BL21 (DE3) 中表現；經過離子交換管柱 (SP、Q) 及 G-75 凝膠管柱的純化處理之後，可以取得均質度達 95% 的酵素，酵素單體的分子量約為 50 kDa 左右。以 *p*-nitrophenyl- $\alpha$ -L-fucopyranoside (PNPF) 為基質進行活性分析，實驗顯示 AFU 在 pH 4.5 以及 pH 6.5 左右存在兩活性最佳區域；當 pH 低於 3.5 或是高於 7.5 後酵素會呈現不穩定狀態。以 PNPF 為反應基質在 pH 5.0 的環境下，其  $K_m$  以及  $k_{cat}$  分別為 0.105 mM 和 48.6 s<sup>-1</sup>；相較文獻中人類肝臟萃取的 AFU ( $K_m = 0.43$  mM,  $V_{max} = 19.6$   $\mu$ mole/mg/min 相當於  $k_{cat} = 16.3$  sec<sup>-1</sup>)，重組酵素的催化能力 ( $k_{cat}/K_m$ ) 約為肝臟原生酵素的 12 倍。

為研究酵素反應之機制，我們利用化學合成法合成一系列具有不同離去基之基質進行 Brønsted relationship 之研究，以離去基 pKa 大於 7.0 為基質，得到 Brønsted constant ( $\beta_{lg}$ ) 約為 -0.27；又因酵素進行催化反應時也觀測到 initial burst 現象，推測其催化作用應涉及兩步驟雙取代之機制，且速率決定步驟應為去醣基 (deglycosylation) 步驟。

本實驗亦進行藥物篩選之研究，利用 ELISA reader 從藥物庫

[Spectrum Collection (MicroSource)] 中進行藥物篩選；我們幸運的篩選得到幾種有效之AFU抑制劑分別為，不可逆抑制劑：Cisplatin、Ebselen；競爭型抑制劑：Ethambutol、Mitoxantrone及非競爭型抑制劑：Dequinium chloride。Cisplatin以及Ebselen推測會與蛋白質中的半胱氨酸（cysteine）形成共價鍵結，使蛋白質結構產生變化或破壞催化區而失去催化活性。競爭型抑制劑Ethambutol對AFU的抑制常數（ $K_i$ ）為 23  $\mu\text{M}$ ；以Ethambutol對不同的醣類水解酵素及不同來源之AFU進行抑制研究，發現Ethambutol對人類AFU具有較佳的專一性；此抑制劑為目前治療肺結核第一線藥物之一。

