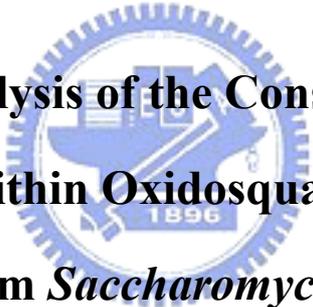


國立交通大學

生物科技研究所 碩士論文

利用定點飽和突變的方法針對酵母菌中氧化鯊烯環化
酵素內高度保留之芳香族胺基酸進行功能性的分析



**Functional Analysis of the Conserved Aromatic
Amino Acids within Oxidosqualene-Lanosterol
Cyclase from *Saccharomyces cerevisiae*
by Site-Saturated Mutagenesis**

研究生：謝文祥

指導教授：吳東昆 博士

中華民國 九十七年七月

**Functional Analysis of the Conserved Aromatic Amino Acids within
Oxidosqualene-Lanosterol Cyclase from *Saccharomyces cerevisiae*
by Site-Saturated Mutagenesis**

研究生：謝文祥

Student: Wen-Shiang Shie

指導教授：吳東昆 博士

Adisor: Dr. Tung-Kung Wu

國立交通大學
生物科技研究所
碩士論文



A Thesis
Submitted to Department of Biological Science and Technology
College of Biological Science and Technology
National Chiao Tung University
in partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of
Master
in
Biological Science and Technology
July, 2008
Hsinchu, Taiwan, Republic of China

中華民國九十七年七月

利用定點飽和突變的方法針對酵母菌中氧化鯊烯環化 酵素內高度保留之芳香族胺基酸進行功能性的分析

學生：謝文祥

指導教授：吳東昆 博士

摘要

在固醇類生合成途徑中，酵素催化直鏈狀的氧化鯊烯形成羊毛硬脂醇的步驟，在近半世紀以來引起科學家極大的興趣。而在真菌與動物體中，由氧化鯊烯-羊毛硬脂醇環化酵素負責催化這個複雜的環化與骨架重排的反應。為了了解酵素中一些具有高度保留性的芳香族胺基酸所具有的功能，我們利用定點飽和突變的方式對酵母菌內其氧化鯊烯環化酵素中 Trp390、Phe528 與 Trp587 等三個胺基酸進行功能性的全面分析。在 Trp390 的功能性分析中，我們發現當 Trp 換成其他三個帶正電荷基團的胺基酸與 Gly 時，因為無法互補原本酵素的功能而使酵素失去活性，而在其他七個突變株 ERG7W^{390X} (X= Asn, Glu, Thr, Cys, Phe, Tyr, Pro) 中，連帶產生了 Achilleol A 與 CamelliolC。這個結果顯示了 Trp390 不僅會影響開環步驟中的 Asp456，還對 A 環的形成有極大的影響。

對照 Trp587 的產物分析結果可以發現，除了 ERG7^{W587F} 與 ERG7^{Trp587Tyr} 外其他突變株都會使酵素失去活性，這表示這個胺基酸在酵素中扮演著極為重要的角色。而在 ERG7^{W587F} 與 ERG7^{W587Y} 突變株中得到了三環與四環的產物，也顯示了 Trp587 在整個環化與骨架重排反應上具有重要的影響。

在 Phe528 飽和定點突變中，有六個突變株 (ERG7^{F528G}、ERG7^{F528A}、ERG7^{F528I}、ERG7^{F528Q}、ERG7^{F528M} 與 ERG7^{F528Y}) 會連帶生成單環的產物的 Achilleol A 與 CamelliolC，不過其生成量都很少。另外，有三個胺基酸 (Asp、Arg 與 Thr) 在功能性補充中，無法互補原本酵素的正常功能。這個實驗結果顯示了 Phe528 可能與酵素受質通道具有一定的關聯。

Functional Analysis of the Conserved Aromatic Amino Acids within Oxidosqualene-Lanosterol Cyclase from *Saccharomyces cerevisiae* by Site-Saturated Mutagenesis

Student: Wen-Shiang Shie

Advisor: Dr. Tung-Kung Wu

Abstract

The enzymatic cyclization of oxidosqualene is one of the most remarkable step in the biosynthesis of steroids and triterpenoids. Oxidosqualene-lanosterol cyclase (ERG7) catalyzes the complex cyclization/rearrangement of (3*S*)-2,3-oxidosqualene to lanosterol in fungi and mammals. In order to clarify the functional role of these highly conserved aromatic amino acids, site-saturated mutagenesis experiments on Trp390, Trp587 and Phe528 residues of *Saccharomyces cerevisiae* oxidosqualene-lanosterol cyclase (ERG7) were carried out. Genetic complementation results of ERG7^{Tyr390} showed that three positive-charged amino acids (His, Lys, Arg) and Gly substitutions cannot complement the yeast viability. Two truncated monocyclic intermediates, achilleol A and camelliol C, were concomitantly produced from ERG7^{W390X} (X= Asn, Glu, Thr, Cys, Phe, Tyr, Pro) . These results suggested that the functional role of Trp390 in affecting both Asp456 to protonate the epoxide ring and the A ring formation.

Functional analysis of Trp587 residue showed that most of the substituted mutations fail to complement the cyclase activity in a yeast ERG7 deficient strain, TKW14C2, except for the ERG7^{W587F} and ERG7^{W587Y} mutants, indicating the importance of this position for the catalytic function of ERG7. Moreover, diverse tricyclic and tetracyclic products were isolated from the ERG7^{W587F} and ERG7^{W587Y} mutants. The result suggested the possible stabilizing role of Trp587 in the ERG7-catalyzed cyclization/rearrangement cascade.

The site-saturated mutations on the ERG7^{F528} revealed that trace amount of two truncated monocyclic intermediates, achilleol A and camelliol C, were concomitantly produced from six ERG7^{F528X} (X=Gly, Ala, Ile, Gln, Met, Tyr). In the functional analysis of ERG7^{F528X} mutants, only three mutations (X=Asp, Arg, Thr) cannot complement the cyclase activity. The homology modeling studies suggested that Phe528 is located in the substrate entrance channel and possibly affect enzymatic activity through substrate binding.

謝 誌

說短不短，說長卻又一轉眼就過去的兩年，終於在這篇論文結束以後將要畫下句點。在最後寫這段謝誌的時候才發現，原來最難的不是一百多頁的論文，而是如何將七百多個日子與對各位的感情與謝意，表現在這短短的一頁。不好意思，我這個人不太會表達自己，但大家對我的幫助，其實我都記得清清楚楚。

能夠完成這兩年的碩士生活，最要感謝的人當然是指導教授吳東昆博士。除了要感謝您當初願意讓我進入這個大家庭磨練，您在實驗上所提供的方向與意見，不時引導我一個正確的方向。另外還有您對研究生生活上的關心，雖然我們作息還是不正常，真的謝謝您了，老師。

接下來要謝謝李耀坤老師、袁俊傑老師與鄭建中老師：謝謝您們在百忙之中抽空審閱、修改我的論文、親臨指導我的口試，並且不吝惜的給予許多寶貴的建議，使我收穫良多。

在實驗室的成員中，最要感謝的人我想很多人都一樣是程翔學長，感謝你在最後這麼短的時間裡幫我修改論文，還有平常你的實驗態度也一直是大家的榜樣，你不只是實驗室的燈塔，也是大家最敬愛的翔哥！恭喜你早我們一步順利畢業，也祝你在未來的研究生涯一路順利。

本來我以為要離開這寂寞的城市，對我來說會很容易，但我錯了。這都是要感謝下面這幾位好朋友，幫我把研生活化作一道美麗的彩虹。媛婷學姊，你那傻裡傻氣的笑容在苦悶的時光裡，總是帶來許多生氣；晉源學長，叫你學長還真不習慣，哪有人叫麻吉學長的，對吧。恭喜你，我走了以後你就可以榮升生科第一竿了。這一年發生了太多，不用多說，因為你們一定會懂！無敵浩呆大景、殺手小妹，雖然你們一個在監獄一個正要進去蹲，但與你們在一起的一切，我相信除非我得老人痴呆，不然也不可能忘記。

另外，已經畢業的文暄學姊、皓宇學長，謝謝你們帶我了解 OSC，你們對我實驗上的指導與幫助，都是我畢業不可或缺的。媽媽，大家應該知道此媽非彼媽，有你在實驗室總是不斷會有新的美食出現，你也算是實驗室吃的燈塔吧。晉豪學長，謝謝你在 GC/MS 上的幫助，還有影視娛樂的提供。文鴻、裕國學長與 Mili，也謝謝你們這兩年裡的陪伴。還有我的同學與學弟妹小高、采婷、亦諄、天昶、禕庭、育勳與剛剛進入實驗室的新成員們，謝謝你們為實驗室所作的一切。

最後要感謝的是我的家人，謝謝你們提供給我這麼好的環境助我求學，讓我沒有後顧之憂。國欽學長、亦涵學姊，這算是對你們遲了兩年的感謝，謝謝你們對我們像是長輩又像好朋友的幫助。還有我的女朋友婷方，我還是不會說好聽的話，但沒有你我走不到這裡，如果你願意，未來我想跟你一起一直一直走下去。

最後，祝福各位都可以一切順利，最重要的是要身體健康，再次感謝各位對我所作的幫助，謝謝！

目錄

中文摘要	I
英文摘要	II
謝誌.....	III
目錄	IV
圖目錄	VII
表目錄	IX
第一章 緒論.....	1
1.1 固醇類的生化角色與重要性.....	1
1.1.1 膽固醇在生物體內扮演的生理角色.....	2
1.1.2 膽固醇的生合成途徑.....	3
1.2 三萜類環化酵素家族的簡介.....	6
1.2.1 三萜類產物的多樣性與特異性.....	6
1.2.2 氧化鯊烯的摺疊結構與環化.....	8
1.3 氧化鯊烯環化酵素家族的簡介.....	10
1.3.1 氧化鯊烯-羊毛硬脂醇環化酵素 (OSC)	12
1.3.1.1 氧化鯊烯環化酵素受質穩定之假說.....	12
1.3.1.2 氧化鯊烯環化酵素的環化機制.....	14
1.3.2 人類氧化鯊烯-羊毛硬脂醇環化酵素.....	21
1.3.3 氧化鯊烯-環阿屯醇環化酵素 (CAS)	24
1.3.4 鯊烯-蛇麻烯環化酵素 (SHC)	28
1.4 (氧化) 鯊烯環化酵素之胺基酸序列比對.....	32
1.5 研究目的.....	38

第二章 實驗材料與方法	44
2.1 實驗材料.....	44
2.1.1 化學藥品與材料.....	44
2.1.2 實驗套組.....	46
2.1.3 菌珠與載體.....	46
2.1.4 培養液與緩衝液.....	47
2.1.5 實驗儀器.....	50
2.2 實驗方法.....	51
2.2.1 重組質體的建構 (The construction of recombinants)	51
2.2.2 酵母菌珠 TKW14C2 與 CBY57 的電穿孔作用.....	56
2.2.3 功能性補充活性篩選.....	57
2.2.4 酵母菌的培養.....	58
2.2.5 非皂化脂質的萃取.....	58
2.2.6 管柱液相色層分析 (Silca Gel Colum Chromatography) ...	59
2.2.7 薄層色層分析 (Thin Layer Chromatography)	59
2.2.8 氣相層析/質譜儀 (GC/MS) 的條件.....	60
2.2.9 突變電腦模擬圖的建構.....	60
第三章 實驗結果與討論	61
3.1 酵母菌 ERG7 ^{Trp390X} 功能性分析.....	61
3.1.1 建構 ERG7 ^{Trp390} 的定點飽和突變株.....	61
3.1.2 ERG7 ^{Trp390X} 突變株功能性補充篩選.....	61
3.1.3 ERG7 ^{Trp390X} 突變株產物分析.....	64
3.1.4 ERG7 ^{Trp390X} 突變株電腦模擬分析.....	67
3.1.4.1 鹼性胺基酸對開環的影響.....	69
3.1.4.2 Trp390 與 A 環形成的關係.....	71
3.2 酵母菌 ERG7 ^{Trp587X} 功能性分析.....	75
3.2.1 建構 ERG7 ^{Trp587} 飽和定點突變株.....	75

3.2.2	ERG7 ^{Trp587X} 突變株功能性補充篩選.....	75
3.2.3	ERG7 ^{Trp587X} 突變株產物分析.....	77
3.2.4	ERG7 ^{Trp587X} 突變株電腦模擬分析.....	80
3.2.4.1	Trp587 與受質間的關係.....	81
3.2.4.2	Trp587 在環化過程所扮演的角色.....	83
3.2.5	ERG7 ^{Trp587X} 產物生成途徑推測.....	87
3.3	酵母菌 ERG7 ^{Phe528X} 功能性分析.....	89
3.3.1	建構 ERG7 ^{Phe528} 飽和定點突變株.....	89
3.3.2	ERG7 ^{Phe528X} 突變株功能性補充篩選.....	89
3.3.3	ERG7 ^{Phe528X} 突變株產物分析.....	91
3.3.4	ERG7 ^{Phe528X} 突變株電腦模擬分析.....	93
3.3.4.1	Phe528 在受質通道扮演的角色.....	94
第四章 實驗結論.....		97
4.1	酵母菌 ERG7 ^{W390X} 功能性分析.....	97
4.2	酵母菌 ERG7 ^{W587X} 功能性分析.....	98
4.3	酵母菌 ERG7 ^{F528X} 功能性分析.....	99
第五章 未來展望.....		101
第六章 參考文獻.....		102
附錄.....		107

圖目錄

圖 1-1	固醇類皆具有相似結構.....	1
圖 1-2	固醇類的合成途徑.....	5
圖 1-3	三萜類環化酵素在不同物種間的特異性.....	7
圖 1-4	氧化鯊烯在酵素內的摺疊方式與其產物途徑.....	9
圖 1-5	Johnson 提出的理論模型 Johnson Model.....	13
圖 1-6	Griffin 所提出的 Aromatic Hypothesis 理論模組.....	13
圖 1-7	OSC 催化氧化鯊烯形成羊毛硬酯醇的環化機制.....	14
圖 1-8	酵母菌 ERG7 與人類 OSC 假設開環環化機制.....	15
圖 1-9	人類 OSC 受質在 B 環的構型與穩定.....	16
圖 1-10	受質 C 環會先形成五圓環.....	17
圖 1-11	Hess 認為 C 環與 D 環會經由過渡態 10 同時形成.....	18
圖 1-12	人類 OSC 高度保留的芳香族性胺基酸.....	20
圖 1-13	人類 OSC 與受質距離在 5Å 內的胺基酸.....	20
圖 1-14	人類 OSC X-ray 晶體結構.....	22
圖 1-15	人類 OSC 與膜結合時的構型.....	22
圖 1-16	SHC 之 X-ray 結晶結構與假設起始環化機制.....	23
圖 1-17	CASI 與 ERG7 中胺基酸保留形式的差異.....	25
圖 1-18	阿拉伯芥 CAS 定點突變產物結構圖.....	27
圖 1-19	SHC 的環化機制與 OSC 十分類似.....	28
圖 1-20	SHC 之 X-射線晶體結構圖.....	29
圖 1-21	抑制劑 Ro48-8071 (灰色) 與 SHC 結合的分子模擬圖.....	30
圖 1-22	SHC 活性區域內假設活性胺基酸的位置與功能.....	31
圖 1-23	各物種間環化酵素序列比對圖.....	33
圖 1-24	Q-W Motif 在環化酵素家族內之分佈情形.....	37
圖 1-25	細菌所得到 6-6-6-5 四環產物的產物途徑推測圖.....	41
圖 1-26	實驗流程圖.....	43

圖 2-1	QuikChange Site-Directed Mutagenesis 示意圖.....	51
圖 3-1	麥角固醇補充篩選與反向篩選示意圖.....	62
圖 3-2	酵母菌 $ERG7^{Trp390X}$ 其產物質譜與其結構對照圖.....	66
圖 3-3	野生型酵母菌 $ERG7^{Trp390}$ 與附近胺基酸結構模擬圖.....	68
圖 3-4	酵母菌 $ERG7^{Trp390}$ 突變株結構模擬圖.....	70
圖 3-5	$ERG7^{Trp390Gly}$ 與野生型的 $ERG7$ 空間結構比較.....	72
圖 3-6	酵母菌 $ERG7^{Trp390}$ 突變株結構模擬圖.....	74
圖 3-7	酵母菌 $ERG7^{Trp587}$ 突變株產物相對應時間圖.....	78
圖 3-8	酵母菌 $ERG7^{Trp587}$ 突變株產物質譜與結構對照圖.....	79
圖 3-9	野生型酵母菌 $ERG7^{Trp587}$ 與附近胺基酸結構模擬圖.....	80
圖 3-10	$ERG7^{Trp587}$ 突變株與野生型 $ERG7$ 其空間結構的比較.....	82
圖 3-11	在 $ERG7^{Trp587}$ 突變株中，受質入塢的結構模擬圖.....	84
圖 3-12	$ERG7^{Trp587}$ 突變株與野生型 $ERG7$ 的空間結構比較圖.....	86
圖 3-13	$ERG7^{Trp587X}$ 產物假設生成路徑推測圖.....	86
圖 3-14	酵母菌 $ERG7^{Trp528}$ 產物質譜與其結構對照圖.....	92
圖 3-15	野生型酵母菌 $ERG7$ 與受質通道口胺基酸結構.....	93
圖 3-16	酵母菌突變株 $ERG7^{Phe528Asp}$ 與附近胺基酸結構模擬圖.....	94
圖 3-17	酵母菌 $ERG7^{Phe528}$ 突變株與附近胺基酸結構模擬圖.....	95

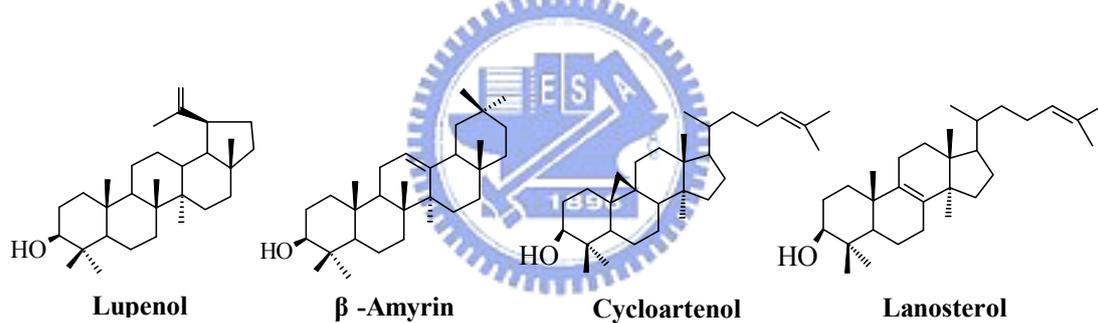
表目錄

表 1-1	阿拉伯芥 CAS 定點突變產物及比例分配表.....	27
表 1-2	SHC 活性區域內胺基酸酵素動力學實驗結果.....	40
表 2-1	飽和定點突變之引子設計.....	52
表 2-2	QuikChange PCR 所用的材料條件.....	52
表 2-3	QuikChange PCR 放大程式.....	53
表 2-4	<i>Dpn</i> I 酵素切除母股 DNA 產物處理材料條件.....	53
表 2-5	特定限制酶鑑定之材料條件.....	55
表 2-6	Sequencing Kit 所用之材料.....	55
表 2-7	Sequencing Kit 所用之溫度.....	55
表 3-1	酵母菌 ERG7 ^{Trp390X} 功能性篩選表.....	63
表 3-2	酵母菌 ERG7 ^{Trp390X} 的產物分析表.....	65
表 3-3	ERG7 ^{Trp390Gly} 與野生型 ERG7 胺基酸相對距離比較.....	71
表 3-4	酵母菌 ERG7 ^{Trp587X} 功能性篩選表.....	76
表 3-5	酵母菌 ERG7 ^{Trp587X} 產物分析表.....	77
表 3-6	ERG7 ^{Trp587} 突變株和野生型 ERG7 與受質的距離比較表...	86
表 3-7	酵母菌 ERG7 ^{Phe528X} 功能性篩選表.....	90
表 3-8	酵母菌 ERG7 ^{Trp528X} 產物分析表.....	91

第一章 序論

1.1 固醇類的生化角色與重要性

固醇類 (Sterols) 是多環脂醇類物質的通稱，其組成通常具有四至六個環作為其結構的中心骨架，並含有一個長短不一且經由不同官能基修飾之側鏈，同時在其 C-3 位置上會有一羥基者稱之。自然界的固醇類普遍存在於動、植物與細菌中，例如：膽固醇 (cholesterol)、麥角固醇 (ergosterol)、 β -麥胚固醇 (β -amyrin)、植物固醇 (phytosterol) 以及其生合成代謝途徑中的上游產物及其衍生物，彼此間皆具有十分相似的結構《圖 1-1》；由於在大多數的真核細胞中，固醇類物質扮演著細胞膜組成及生理調控的重要角色¹，所以固醇類的生合成途徑與其代謝調節機制一直是近年來十分重要的研究課題。



《圖 1-1》固醇類皆具有相似結構

在動物體內，最常見的固醇類物質以膽固醇 (Cholesterol) 最為重要。而膽固醇是一種類似脂肪的複合體，主要是由肝臟所製造產生，其次是在腸、腎上腺皮質及動脈管壁上生成，同時也可經由食物的攝取而獲得²。膽固醇在動物體內參與了許多新陳代謝相關的生理調控。由於它是細胞膜的重要成分可以調控細胞膜的流動性，進而影響胞內外物質的滲透。此外膽固醇亦可藉此調控細胞膜上之蛋白質使其進行訊息傳遞、代謝反應與催化等作用³。另外，膽固醇也是膽汁、固醇類荷爾蒙、維生素 D₃、紅血球與其它五種固醇類激素的重要前驅物，如：糖皮質固醇 (Glucocorticoids) 中的皮質醇 (Cortisol)、

礦物皮質固醇 (Mineralocorticoids) 中的醛固酮 (Aldosterone)、雄性激素 (Androgens)、雌激素 (Estrogens) 與黃體酮 (Progestins)。人體也可利用膽固醇，自行合成脂溶性維生素 D₃，而維生素 D₃ 是一種具有激素功能的固醇，會影響鈣質吸收，進而造成血鈣與骨鈣的回饋循環平衡，並刺激基因表現與增加骨質的密度⁴。此外，膽固醇也是脂質筏 (Lipid raft) 的組成成分。Lipid raft 是指細胞膜中一塊固性區域，當細胞膜上膽固醇比例增加時，細胞膜的流動性會減少，即一塊較不具流動性的富含膽固醇的區域⁵。許多文獻的研究也指出，脂質筏可能與訊息傳遞、發炎反應、細胞移動 (Migration)、神經傳導等反應有關，如：阿茲海默症 (Alzheimer's disease) 等⁶。此外，在酵母菌的實驗也發現，部份具特定結構的固醇類，以及其相對應的激素，對於細胞分裂中增生週期的調控，有密切的相關性。因此，固醇類及三萜類天然物在酵母菌、動、植物細胞一直被廣泛注意^{7,8}。

1.1.1 膽固醇在生物體內扮演的生理角色

膽固醇在體內的運送需要藉由與脂蛋白結合的方式來運送，主要可分為三種脂蛋白：(1) 非常低密度脂蛋白 - 膽固醇 (VLDL-cholesterol)，負責從肝臟中將脂質攜帶至全身各組織，同時 VLDL 也會轉變為 LDL；(2) 低密度脂蛋白 - 膽固醇 (LDL-cholesterol)，將膽固醇運送至全身各部位，但若含量過高的會對人體不利，是造成血管阻塞、硬化的元凶；(3) 高密度脂蛋白 - 膽固醇 (HDL-cholesterol)，可將黏在血管上多餘的膽固醇運送回肝臟進行代謝排除，以降低血液中總膽固醇的含量。另外藉內每日飲食所攝食的脂肪，經由腸胃道吸收而形成的乳糜微粒 (chylomicrons) 還有非常高密度脂蛋白 - 膽固醇 (VHDL-cholesterol) 也都會參與脂質的控工作。然而，在人體受到自由基攻擊時，或處於高氧化壓力的情況之下，血液循環中的 LDL 會被修飾，也就是進行乙醯化作用或其 LDL apo B (LDL apolipoprotein B, 低密度脂蛋白表面脂蛋白 B) 會被氧化而

形成ox-LDL（氧化型低密度脂蛋白），使其失去攜帶膽固醇之能力，進而引起高血壓、心臟病、動脈粥狀硬化、中風……等心血管疾病的發生⁹⁻¹¹。另外，在黴菌中，固醇類生合成途徑的最終產物—麥角固醇為黴菌胞膜上的重要組成，也是不可或缺的存活因子。因此，目前許多先進的分子生物學技術已被大量用來研究生物體中固醇類及三萜類天然物的重要性，了解其代謝上的反應途徑，用以發展抗黴菌及降膽固醇的藥物^{12,13}。

1.1.2 膽固醇的生合成途徑

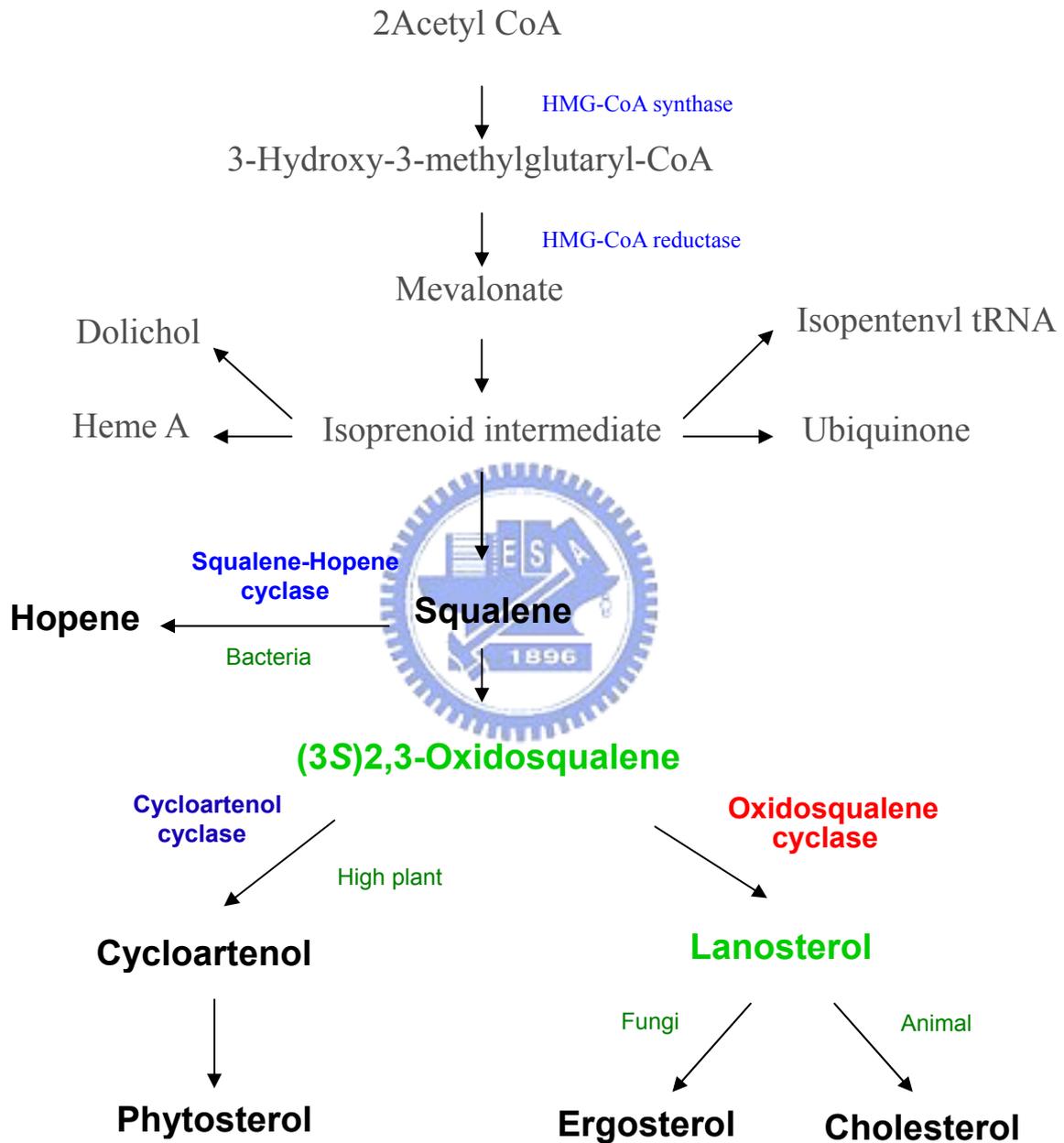
自然界固醇類的生合成，是由兩個碳的乙醯輔酶-A (Acetyl-CoA) 開始合成，在經由幾個步驟的反應縮合後，利用其速率決定步驟—3-羥基-3-甲基戊二醯輔酶A還原酶 (HMG-CoA reductase) 的催化而形成二羥甲基戊酸 (Mevalonic acid)，之後再經一連串的ATP水解參與反應，進而生成異戊二烯類的中間物 (Isoprenoid intermediates)，隨後六個五碳的異戊二烯單元體經過縮合及還原反應形成二萜基焦磷酸鹽 (geranyl pyrophosphate) 與三萜基焦磷酸鹽 (farnesyl pyrophosphate) 最後產生疏水性的鯊烯 (Squalene)。鯊烯經氧化代謝生成的氧化鯊烯，會經由環化及一連串反應，進而合成其最終產物¹⁴。值得注意的是，在不同物種間，生物體會分別利用鯊烯或氧化鯊烯作為其環化起始物。例如，在細菌或一些原核生物及低等植物中它們會利用鯊烯環化生成蛇麻烯 (Hopene)，而高等植物、真菌、動物……等則會由氧化鯊烯進行環化，並經一連串反應而生成植物固醇、麥角固醇、膽固醇等固醇類的產物《圖1-2》。

以往在降膽固醇的藥物研究方面，主要是著重於HMG-CoA Reductase來做為抑制劑的研究對象，然而此一方式卻會影響其下游產物異戊二烯中間物與三萜類化合物的生成，進而影響具有重要功能的二次代謝物的生成與調節。由於固醇類生合成代謝途徑中的環化酵素

一氧化鯊烯環化酵素（Oxidosqualene Cyclase；OSC）位於整個反應的中下游，若由此處做為研發抑制物的研究標的，對身體的副作用理論上會相對較小，故近年來OSC已逐漸成為抗黴菌及降膽固醇藥物的研發目標¹⁵。此外，由於此環化酵素的環化反應，涉及了包括十幾個鍵的斷裂、形成及碳骨架的重排、去質子化等步驟(終止脫除反應)，如此高度複雜且極具效率的環化反應，更強烈地引發我們想去探究的興趣。



Sterol Biosynthetic Pathway



《圖1-2》 固醇類的合成途徑

1.2 三萜類環化酵素家族的簡介

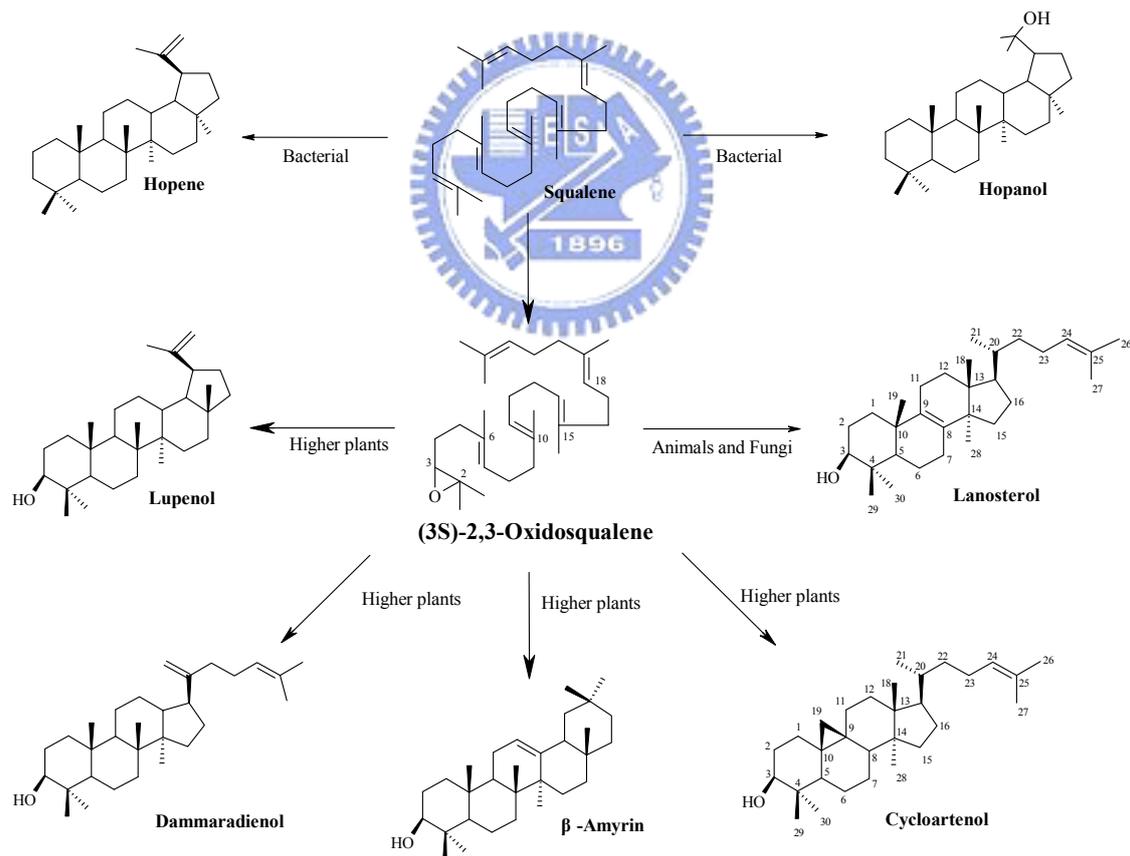
三萜類化合物 (Triterpenoid) 是一群由三十個碳的前驅物衍生而來的多烯類產物。目前，已知天然來源而產生的不同多烯類骨架的三萜類化合物有近兩百多種¹⁶。這些三萜類化合物，主要是由自然界的三萜類環化酵素家族，經由單一步驟的酵素催化反應，並藉由酵素與受質間的鏡像或立體選擇性的環化及骨架重排作用，而生成如此多樣的產物，而這些產物泛存於自然界的各物種中形成產物多樣性。然而，正因為此一催化反應的複雜性與其產物的多樣性，三萜類環化酵素家族對於其催化鯊烯 (Squalene) 或氧化鯊烯 ((3S)-2,3-oxidosqualene) 進行環化反應，而形成多環多烯類 (terpenes) 的催化機制在這半世紀以來一直是分子生物學家及化學家所公認是最迷人及最具挑戰性的生物轉化反應之一。

三萜類在不同物種間依其所使用之酵素，能分別將直鏈狀多烯類的鯊烯或氧化鯊烯，經由其單一生物轉化的過程，催化形成多個不對稱立體中心的多環類脂醇或三萜類化合物¹⁷。整個環化過程包括雙鍵或環氧鍵 (Epoxide) 的質子化 (Protonation)、誘導開環、環化 (Cyclization)、甲基與氫化鍵之重組 (Rearrangement)、與最後的終止脫除 (Elimination) 反應。

1.2.1 三萜類產物的多樣性與特異性

三萜類化合物依物種的特異性會分別利用不同之環化酵素來進行三萜類的環化反應。例如在細菌中，直鏈狀的鯊烯會經由鯊烯-蛇麻烯環化酵素 (Squalene - Hopene Cyclase; SHC) 的環化作用而生成具有五環的產物—蛇麻烯 (Hopene)，或藉其他環化酵素的反應而生成蛇麻醇 (Hopanol) 或里白醇 (diplopterol) 等環狀產物；在較高等的植物與藻類中，氧化鯊烯可以被環阿屯醇合成酵素 (Cycloartenol Synthase; CAS) 環化而生成五環之環阿屯醇 (cycloartenol)，或是

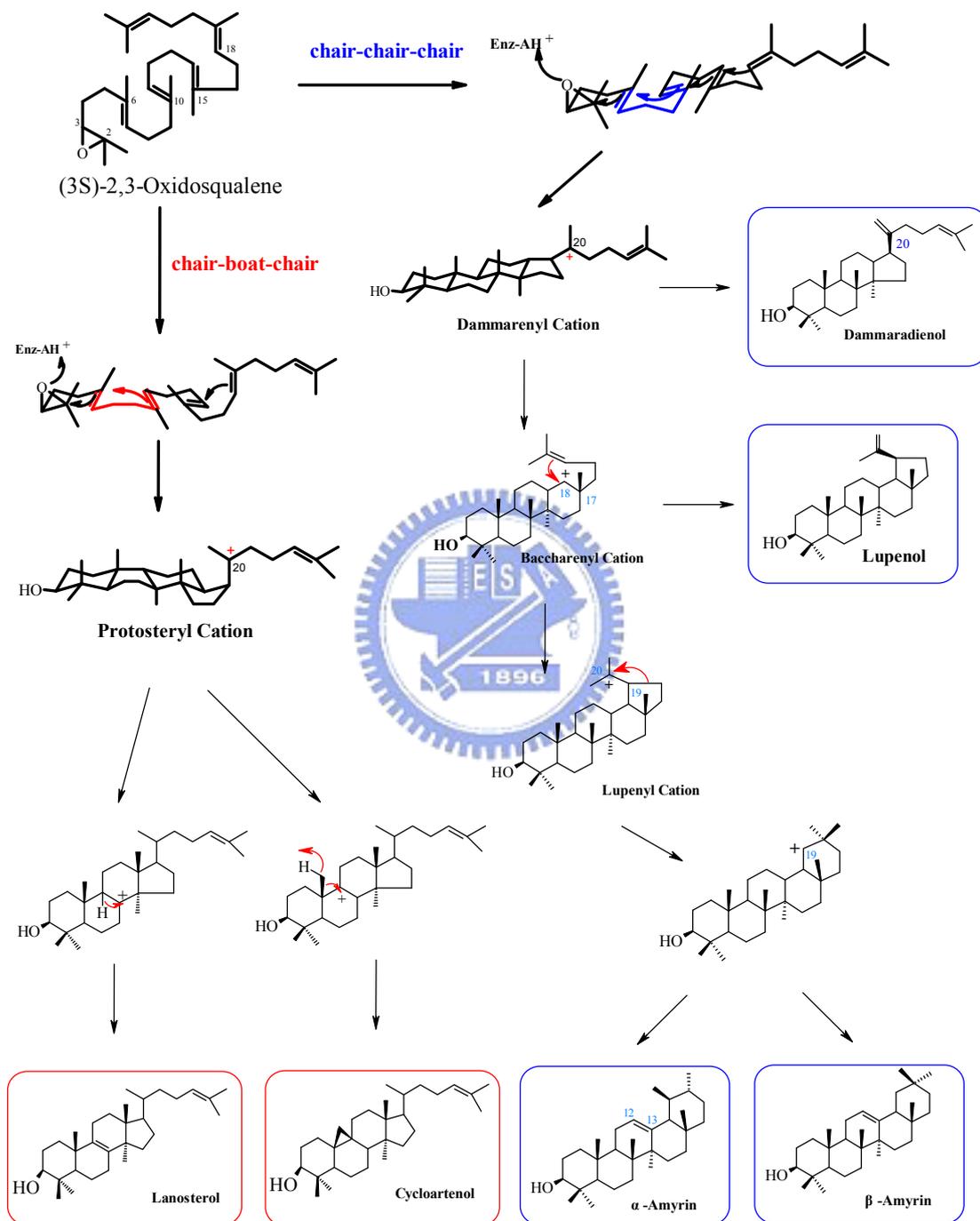
經由羽扇醇合成酵素（Lupeol Synthase；LUS）的作用而合成五環的羽扇醇（Lupeol），亦可以被香桂素合成酵素（Amyrin Synthase；AMS）環化而形成五環的 α -香桂素（ α -Amyrin）或 β -香桂素（ β -Amyrin），又或藉其他環化酵素環化而形成不同的四環至六環的產物；而在動物、真菌與其它甲基營生菌（methylotrophic bacterium）中，氧化鯊烯-羊毛硬脂醇環化酵素（Oxidosqualene-Lanosterol Cyclase；OSC）則會將氧化鯊烯環化形成四環之羊毛硬脂醇（Lanosterol；LA）。這些具有物種專一性的環化產物，可分別依反應的產物骨架的複雜性進而區分為 6-6-6-5 四環、6-6-6-6-5 五環、6-6-6-6-6 五環或其它單環、雙環、三環與六環的三萜類化合物¹⁶《圖 1-3》。



《圖 1-3》三萜類環化酵素在不同物種間的特異性

1.2.2 氧化鯊烯的摺疊結構與環化

在三萜類的環化過程中，一開始是由環化酵素中的酸性胺基酸提供電子，進而使得親核性的雙鍵或是環氧基藉由其親核性作用進行開環起始反應。而在整個環化過程中包含了 16 個鍵的斷裂與生成，並經過一連串的碳陽離子-烯烴環化作用 (cation-olefin cyclization) 生成帶有正電的高能碳陽離子中間產物 (cationic intermediates)。而大部分的碳陽離子中間產物皆只存在於十分短暫的時間，所以並不容易被科學家所分離。此外，鯊烯在其環化酵素的活性區域中，會依全椅形的形式 (all-chairform) 摺疊，而相對地氧化鯊烯在不同的氧化鯊烯環化酵素活性區域中，經由不同物種的環化酵素上胺基酸殘基的誘導，則會有兩種摺疊的方式：椅形-船形-椅形 (chair-boat-chair) 與椅形-椅形-椅形 (chair-chair-chair)，依這些摺疊方式來進行上述開環反應進而形成碳陽離子中間產物³。正因為相同的反應受質在酵素中具有不同的摺疊方式，所以造成了立體構形相異的反應機制，經質子化及一連串的雙鍵電子轉移後，會生成二種類型的碳陽離子中間物如：(一) 經由 chair-boat-chair 骨架摺疊生成的原脂醇碳陽離子中間物 (Protosteryl Cation intermediates)；(二) 經由 chair-chair-chair 骨架摺疊會形成達瑪烯碳陽離子中間物 (Dammarenyl Cationintermediates)。其中原脂醇碳陽離子中間物經過不同的甲基與氫化基的轉移等骨架重排作用後，會在不同位置進行脫氫反應，或是藉由水分子作用來終止反應進而形成環阿屯醇、羊毛硬脂醇和南瓜子雙烯脂醇 (Cucurbitdienol)；而達瑪烯碳陽離子中間物在不同酵素中可以被繼續誘導環化而形成 6-6-6-6-5 及 6-6-6-6-6 五環的碳陽離子中間物，接著在經由類似的骨架重排與脫氫作用而生成達瑪雙烯醇 (Dammaradienol)、羽扇醇、 α -香桂素及 β -香桂素等¹⁸⁻²⁰《圖 1-4》。



《圖 1-4》氧化鯊烯在酵素內的摺疊方式與其產物途徑

1.3 氧化鯊烯環化酵素家族的簡介

氧化鯊烯環化酵素屬於自然界三萜類環化酵素家族的一類，包含許多環化酵素，如：氧化鯊烯-羊毛硬脂醇環化酵素（OSC）、氧化鯊烯-環阿屯醇環化酵素（CAS）、羽扇醇合成酵素（LUS）、香桂素合成酵素（AMS）等。主要是利用氧化鯊烯（Oxidosqualene；OS）作為其反應受質，並催化其進行複雜的生物轉換反應進而生成下游的二次代謝產物的前驅物，如：固醇類、膜組成物、固醇類激素或其他二級代謝物。

對於氧化鯊烯環化酵素的研究已經行之有年。1970年，Robinson發現酵素必須將受質的碳原子折疊在膽固醇結構的相似位置才可進行催化反應²¹。Bloch與Cornforth則利用混入實驗（incorporation）直接證明了在羊毛硬脂醇合成反應機制中，酵素具有催化甲基與氫化基轉移的骨架重排反應的能力²²。而Corey與Bloch則進一步證明了哺乳類中其氧化鯊烯環化酵素合成羊毛硬脂醇的反應受質是2,3-氧化鯊烯而非鯊烯²³。Barton則更進一步證明真核生物是利用3(*S*)-2,3-氧化鯊烯做為其環化的反應受質，而非3(*R*)的鏡像異構物^{24,25}。另外，Corey藉由合成氧化鯊烯環化酵素所催化生成的可能中間物，探討此單一步驟高效率的生物轉化，如何將不具立體中心的氧化鯊烯環化生成具多個不對稱立體中心的反應機制¹⁷。而Ruzicka與其研究團隊，也利用生命期短以及離子性的中間物，建構出立體化學的假說²⁷。同時，Corey和Matsuda也以實驗證明環氧基的親電性活化開環，及需要酸性基團作為其質子供應者以誘導活化開環^{28,29}。

在先前的研究中指出，若將鯊烯置於中性或是弱酸的溶液中，在室溫下可穩定地存放一天，因此強酸被認為是在開環的起始反應中所必需的²⁷。而突變實驗也證明了胺基酸Asp在氧化鯊烯環化酵素家族中具有高度保留性並且為催化所必須之胺基酸³。因此，Asp被認為是誘導環氧基開環的重要基團，可以提供質子進行開環。

在環化反應方面，受質經由受質通道進入酵素以後酵素上的胺基酸基團電子會誘導受質摺疊成適當結構，再經由酵素上酸性基團Asp誘導開環，過程中會形成許多具有高能量的碳陽離子中間產物，進而進行環化與骨架重排等反應。最後再經由酵素胺基酸與受質間的牽引交換，或是藉由水分子的作用以提供氫氧基來吸引電子，進而形成雙鍵或是由所提供的氫氧基團形成雙醇類產物而終止反應。目前約有近200種氧化鯊烯環化酵素的產物被報導出來^{30,31}，這些產物經由類似的催化機制都具有相似的骨架結構，但是由於酵素活性區域與受質結合區的不同，導致其在環化骨架上的差異，另外經由甲基與氫化基的重排也會產生許多不同的碳陽離子中間產物，最後則依不同的碳陽離子的脫除（cation-quenching）步驟中止反應，進而成多樣的產物。

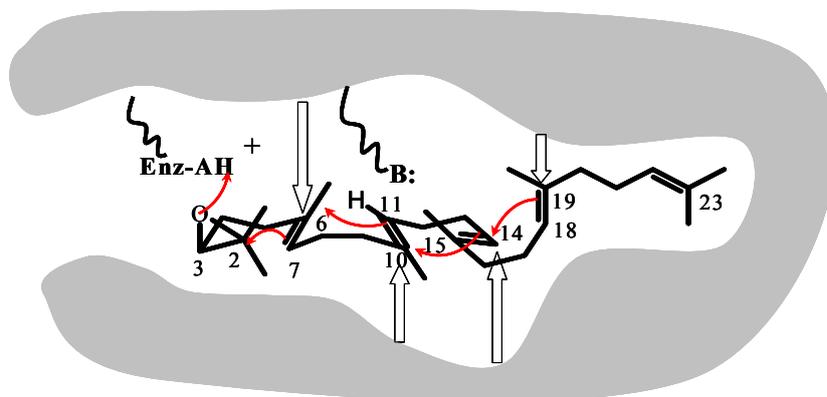


1.3.1 氧化鯊烯-羊毛硬脂醇環化酵素 (OSC)

在氧化鯊烯環化酵素家族中，存在於真菌類與動物中的氧化鯊烯-羊毛硬脂醇環化酵素其主要負責催化受質氧化鯊烯進行環化反應而形成四環的羊毛硬脂醇，進而代謝形成重要的生理物質麥角固醇與膽固醇。在酵母菌 (*Saccharomyce cerevisiae*) 中，*S.c.* ERG7是一種由 *ERG7* 基因所轉譯出來的膜蛋白，由2,196個鹼基對轉譯而生成731個胺基酸序列，而其理論蛋白質分子量為83.7 kDa。正因為此酵素與膜結合的特性，再加上其分子量很大，因而造成酵素在純化上十分不易，至今尚未有結晶結構被解析出來，也因此在其結構與催化機制方面的探討仍然有限。目前在對ERG7環化反應機制的研究方面，主要是利用分生技術及反應受質類似物進行探討，通常會透過以下三種方式：(1) 利用氧化鯊烯的類似物來取代受質進行環化機制的研究。(2) 比對不同物種之羊毛硬脂醇環化酵素之蛋白質序列與基因選殖，從得到的序列資訊進行結構與機制上的探討。(3) 以定點突變的方式來研究酵素上某些胺基酸基團在環化機制上所扮演的角色。而這三種方法中又以第三種最為普遍，經由突變實驗所得到的新產物可以讓科學家藉此推測環化過程中胺基酸的催化功能。

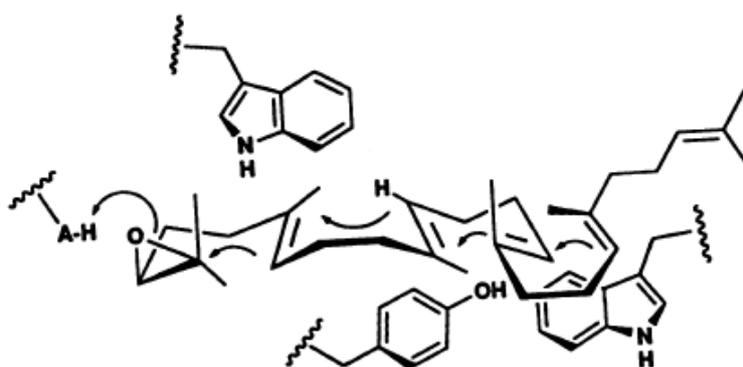
1.3.1.1 氧化鯊烯環化酵素受質穩定之假說

針對OSC的受質專一性和反應的立體化學等特性，有兩種假說被提出來，用以說明酵素是如何穩定這些具有高能量的碳陽離子中間產物。1987年，Johnson提出了第一個理論模型 (Johnson Model) 《圖 1-5》，在這個模型中Johnson認為酵素會利用具相位選擇性 (facing selective) 的負電荷來穩定過渡狀態 (transition state) 的正電高能量的碳陽離子^{32,33}。



《圖1-5》 Johnson提出的理論模型Johnson Model^{32,33}

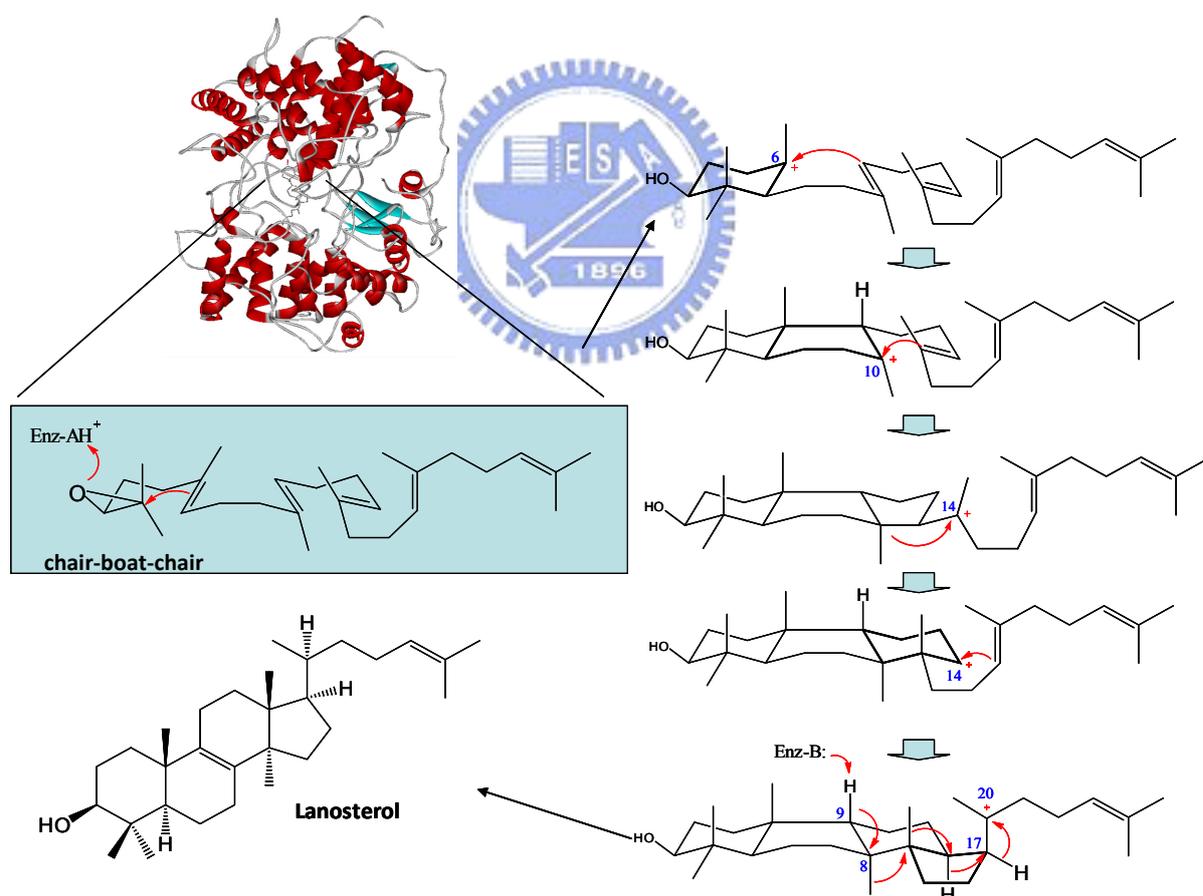
另外，在1992年Griffin也提出了另一個Aromatic Hypothesis的理論模組³⁴《圖1-6》。由於在氧化鯊烯環化酵素中，具有芳香族基團的胺基酸Tyr、Trp與Phe在各物種中皆具有高度保留性，因此Griffin認為這些基團會利用碳陽離子- π 電子作用（cation- π interaction）的穩定效應，來引導受質進行適當的骨架摺疊並且穩定具有高能量且帶正電的中間產物，使其之後的甲基與氫化基可以做適當的轉移重排。



《圖1-6》 Griffin所提出的Aromatic Hypothesis理論模組³⁴

1.3.1.2 氧化鯊烯環化酵素的環化機制

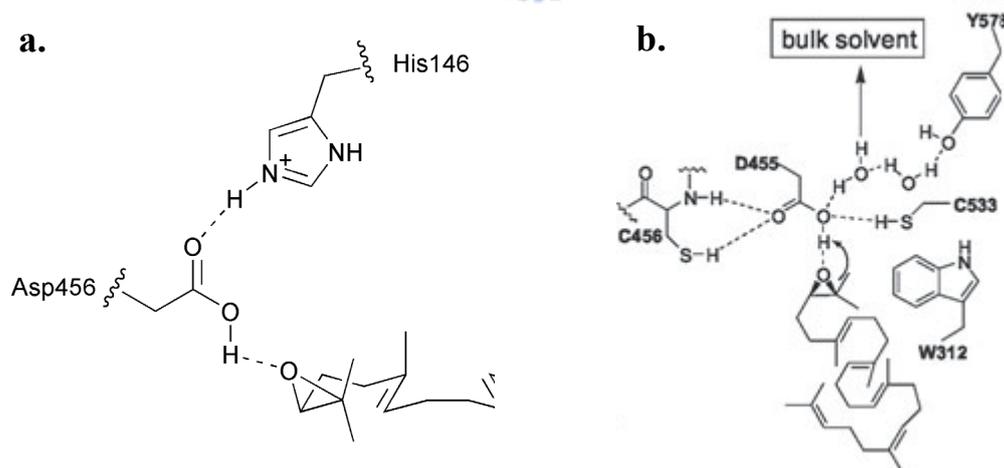
氧化鯊烯-羊毛硬脂醇環化酵素的環化機制包含了數個步驟，並且會產生許多高能量的碳陽離子中間物。首先，酵素會誘導受質(3*S*)-2,3-氧化鯊烯在活性區域摺疊成椅形-船形-椅形 (chair-boat-chair) 的構型。接著酸性胺基酸Asp455 (human OSC) 會提供質子來誘導環氧基進行開環反應，進而引起電子的轉移環化而形成A至D環，最後碳陽離子會落在C-20位置上而形成原脂醇碳陽離子中間物 (Protosteryl Cationic intermediate)。最後經過甲基與氫化基的轉移後，酵素會藉由鹼性胺基酸或是與水的交互作用進行脫氫反應而形成最終的產物羊毛硬酯醇《圖1-7》。



《圖1-7》 OSC催化氧化鯊烯形成羊毛硬酯醇的環化機制

(一) 開環起始反應

在人類OSC的結晶結構尚未被解析出來之前，科學家多藉由透過受質類似物與OSC做親和性標定 (Affinity labeling)，或以定點突變的方式來推測反應機制⁴⁰。1997年，Corey等人利用一系列的丙胺酸定點突變式掃描法 (alanine scanning site-directed mutagenesis) 針對酵母菌ERG7的活性區域內高度保留性的胺基酸進行實驗，實驗結果顯示酵母菌ERG7中His146、His234、Asp456位置在催化機制上扮演十分重要的角色^{41,42}。這些研究認為ERG7在催化環氧基開環反應時，His146會藉由氫鍵拉扯效應來增強Asp456的酸性，進而提供質子促使環氧基質子化而開環《圖1-8a》⁴³。同樣地，由人類OSC的X-ray結晶結構可以發現，Cys456和Cys533兩者皆與Asp455間有氫鍵連結，可藉此增強Asp455的酸性以誘導環氧基的質子化開環，同時Asp455還可透過與水分子及Glu459的羧酸基團作用，或是藉由最後脫氫步驟的質子轉移而再質子化《圖1-8b》^{44,45}。另外有許多研究也相信，在經由質子化開環反應後，會同步引起A環的環化形成，這兩個步驟目前為止被認為是同步發生的⁴⁶⁻⁵⁰。

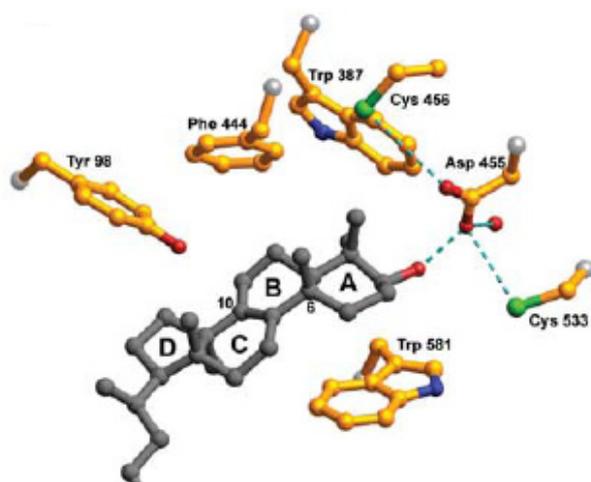


《圖1-8》 a. 酵母菌OSC假設開環環化機制⁴³ b. 人類OSC開環環化機制^{44,45}

(二) 環化的過程

早期在環化機制尚不清楚的時候，Matsuda等人在研究B環形成時發現在酵母菌ERG7內的胺基酸Val454位置具有高度的保留性。同樣的，對應到植物CAS的Ile481位置亦然。所以他們利用分子生物學的方法將Val454突變成同為疏水性胺基酸的Phe、Leu與Ile，還有立體空間較為簡單的Ala與Gly。實驗的結果顯示在Ala與Gly的突變中，會得到單環的產物，所以他們認為Val454會藉由其立體空間較大的側鏈來幫助B環的形成⁵¹。

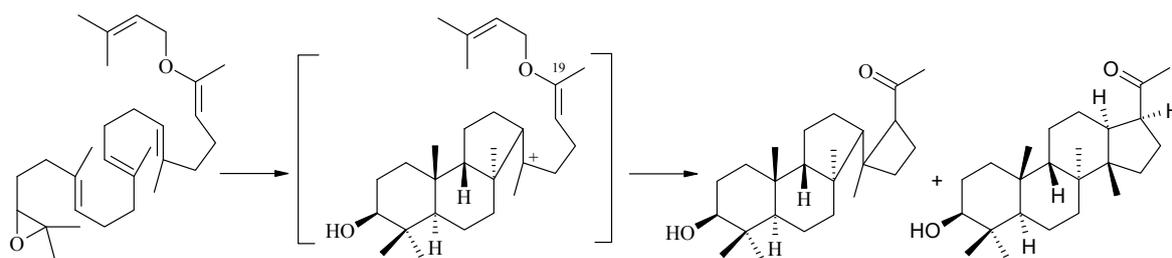
在2004年Nature所發表的人類OSC結晶結構中，Thoma等人指出幾個具有高度保留性的胺基酸位置，其中Trp387、Phe444與Trp581(對應到酵母菌ERG7分別為Trp390、Phe445與Trp587)會利用其含有苯環的側鏈，並透過碳陽離子- π 共振交互作用來，穩定形成A環與B環時產生的C-6和C-10的碳陽離子中間產物。然而，在酵母菌ERG7 Phe445的定點突變實驗裡，卻得到了三環與在不同地方去質子化的四環產物。這也證明了在酵母菌ERG7中，Phe445會影響在C環形成時的C-14碳陽離子中間物與最後在C-8/C-9的去質子化步驟⁵²。另外，在B環形成時，能量較不傾向的船形結構方面，Thoma認為Tyr98位置其立體空間較大的側鏈推動氧化鯊烯C-10上的甲基至到分子平面之下，而進一步地阻礙B環形成能量較傾向的椅形構形《圖1-9》³⁵。不



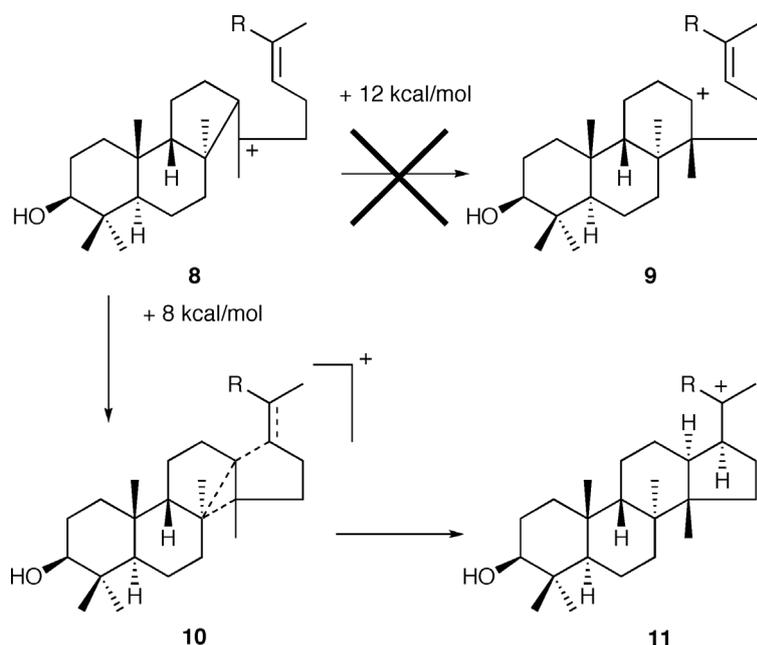
《圖1-9》 Trp387、Phe444、Trp581穩定A環與B環形成時的C6、C10-碳陽離子中間物；Tyr98的側鏈藉由立體空間障礙促使B環形成能量較不傾向的船形結構³⁵

過在酵母菌ERG7胺基酸Tyr99位置的飽和定點突變實驗結果中，Tyr99已被證實是與C-14碳陽離子的穩定有關，在此位置進行突變則會得到 (13 α H)-isomalabarica-14E,17E,21-trien-3 β -ol、(13 α H)-isomalabarica-14Z,17E, 21-trien-3 β -ol與羊毛硬脂醇等相關產物⁷⁷。

1995年，Corey等人在以20-oxaosqualene取代氧化鯊烯作為受質的實驗中，發現除了6-6-6-5的四環產物以外還有6-6-5的三環系統產物。所以他們藉此結果推測，在C環形成的過程中會先形成五圓環，再經由擴環反應而成為六圓環《圖1-10》^{53,54}。另一方面，利用電腦模擬所作的理論能量計算方面，也認為C環的環化過程會先形成五圓環再行擴環作用成為六圓環⁵⁵；Hess則從他的計算結果認為6-6-5的三環碳陽離子中間物為環化過程中的第一個中間物，而之後C環與D環的形成會經由過渡態10而同時發生，並非為先前所認為的會先形成六圓環的C環再行擴環作用而產生《圖1-11》^{56,57}。另外Gao在其以SHC為受質的理論計算的研究中，則是認為在整個環化過程中只會生成單環與雙環的碳陽離子中間物，其C、D與E環都是同時形成的⁷⁶。



《圖1-10》利用類似物作為受質結果顯示C環會先形成五圓環

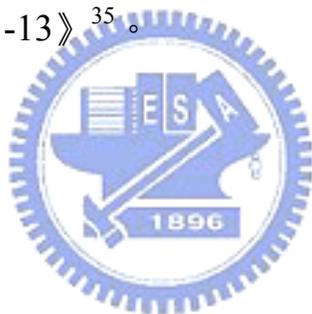


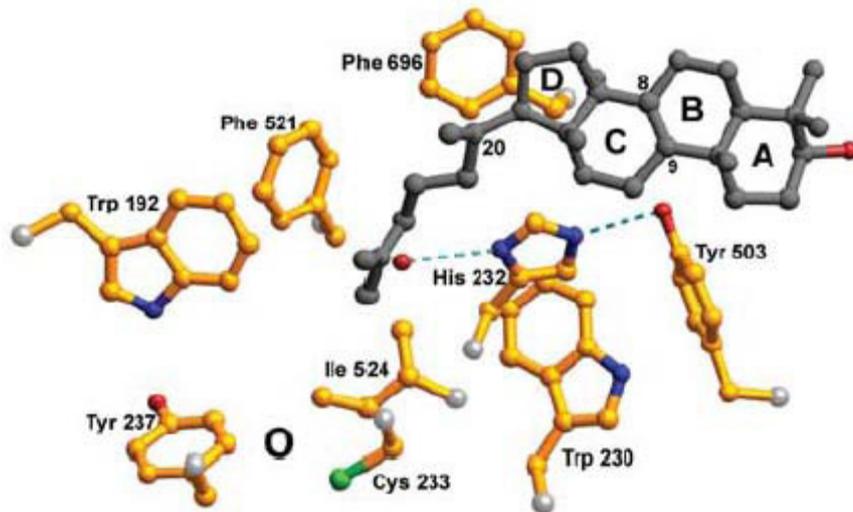
《圖1-11》Hess認為C環與D環會經由過渡態10同時形成⁵⁸

在人類OSC的結晶結構中，His232與Phe696被認為它們可以藉由其胺基酸側鏈上所富含 π 電子的特性，來穩定形成C環時依反-馬可尼可夫（anti-Markovnikov）法則產生二級碳陽離子，並且可以利用碳陽離子- π 共振作用來穩定帶有正電荷的高能C-20碳陽離子中間物。然而在酵母菌ERG7胺基酸Phe699位置的定點突變實驗中，除了發現三環的相關產物以外，還發現了在不同位置脫氫的產物，這結果顯示Phe699也會對C-17碳陽離子有所影響⁷⁸。最後氧化鯊烯一連串的環化步驟會終止在五圓環的D環所形成的C-20原脂醇碳陽離子，這是因為OSC缺少像SHC中Trp169與Phe605的芳香族性官能基，因此無法藉由其 π 電子來穩定C-17二級碳陽離子中間物使其有較長的生命期，而能更進一步的環化形成E環。

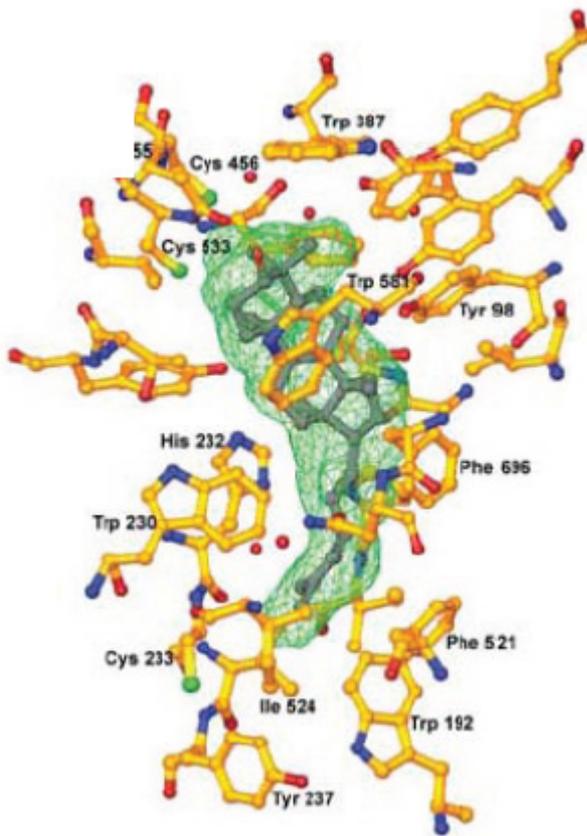
(三) 骨架重排與脫氫反應

在環化反應結束之後，酵素會藉由其活性內許多具有高度 π 電子性質的芳香族基團之胺基酸（如Trp192、Trp230、His232、Tyr237、Tyr503、Phe521與Phe696等），透過碳陽離子- π 電子的共振作用來穩定甲基與氫化基的轉移重排，使得C-20四級原脂醇碳陽離子順利轉變成為C-8/C-9碳陽離子中間物《圖1-12》^{3,35}。在整個骨架重排過程結束之後，於人類OSC中，具有高度保留性的胺基酸His232（對應到酵母菌ERG7為His234），由於其鹼性殘基十分靠近C-8/C-9碳陽離子，所以被認為是能夠接受質子，並進而進行整個環化機制的最後步驟—脫氫反應的關鍵胺基酸位置。另外，His232除了會透過鄰近的水分子的交互作用去影響催化反應的進行外，還會與其附近的Tyr503之側鏈上的氫氧基團產生氫鍵互相拉扯作用，使得His232得以位於脫氫反應的最佳位置《圖1-13》³⁵。





《圖1-12》具有高度保留性的芳香族性胺基酸 Trp192、Trp230、His232、Tyr237 Tyr503、Phe521與Phe696可以利用碳陽離子- π 電子共振交互作用去穩定甲基與氫化基的骨架重排³⁵。



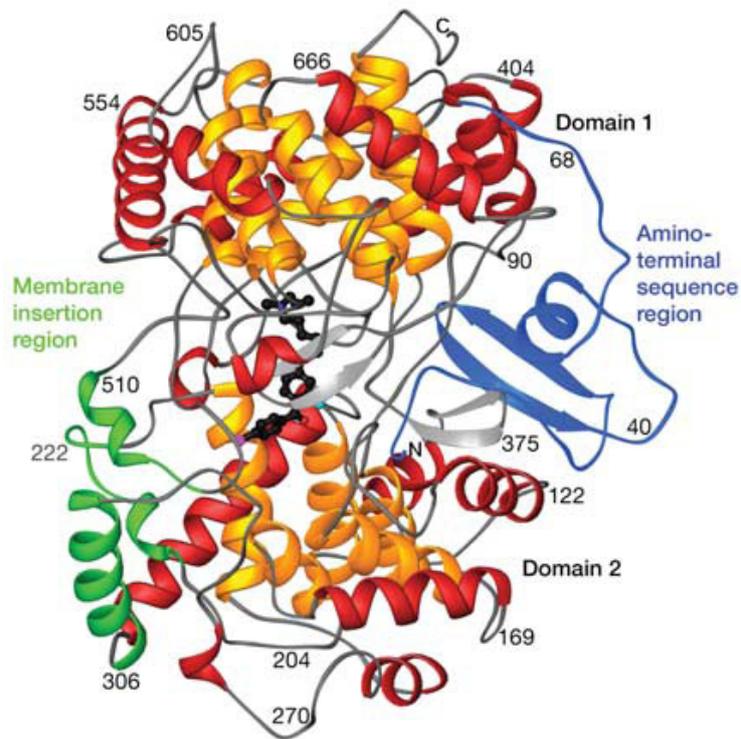
《圖1-13》氧化鯊烯環化酵素與其產物-羊毛硬脂醇形成複合物的結構圖。圖中所顯示的胺基酸基團為距離產物在 5Å 內的位置，水分子只有在 Asp456 及 His232 附近被觀察到³⁵。

除了人類OSC的結晶結構外，在酵母菌ERG7中對於His234與Tyr510的飽和定點突變的實驗結果也更進一步的證明了這兩個胺基酸在活性區域內所具有的功能。在酵母菌ERG7中His234的定點突變產生了許多在不同地方進行脫氫反應的四環產物如protosta-20,24-dien-3 β -ol、protosta-12,24-diene-3 β -ol還有parkeol^{59,60}。另外，在Tyr510突變成Ala的突變點中也發現了parkeol^{61,62}。綜合以上結果，更加證明了His234在酵母菌ERG7活性區域中的功能，除了利用碳陽離子- π 電子的共振作用穩定甲基與氫化基的骨架重排以外，也會幫助酵素在正確的位置上進行脫氫反應⁶³。

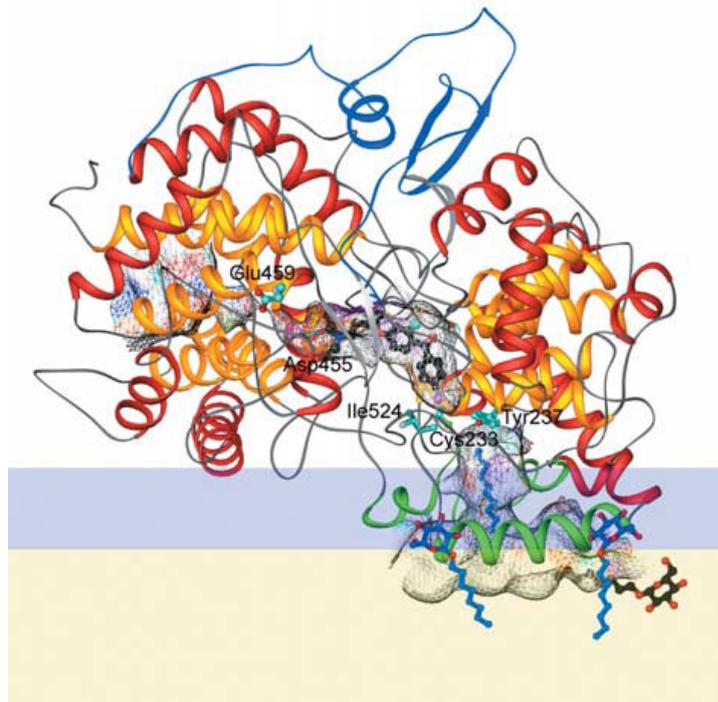
1.3.2 人類氧化鯊烯-羊毛硬脂醇環化酵素 (OSC)

人類氧化鯊烯-羊毛硬脂醇環化酵素之X-ray晶體結構已經被Thoma等人在2004年解出，發表於當年的Nature期刊中³⁵。由於OSC結構的確定《圖1-14》，使得學者得以對於酵素活性區域以及其胺基酸基團可能參與的反應機制有更進一步了解，並且可以利用人類OSC的結晶結構做為模版，提供結構與反應機制等相關訊息，來研究不同物種裡面的氧化鯊烯環化酵素。

由人類OSC的結晶結構中可以得知，此酵素位於膜的部分有一個直徑約25Å的通道，此通道被認為是受質氧化鯊烯進入疏水性活性區域的入口，並且會對活性區域具有分隔的作用。此受質通道會藉由其環狀區域胺基酸516~524區域與697~699區域的重排作用，或是藉由Tyr237、Cys233及Ile524等胺基酸其側鏈構形的改變來形成《圖1-15》。

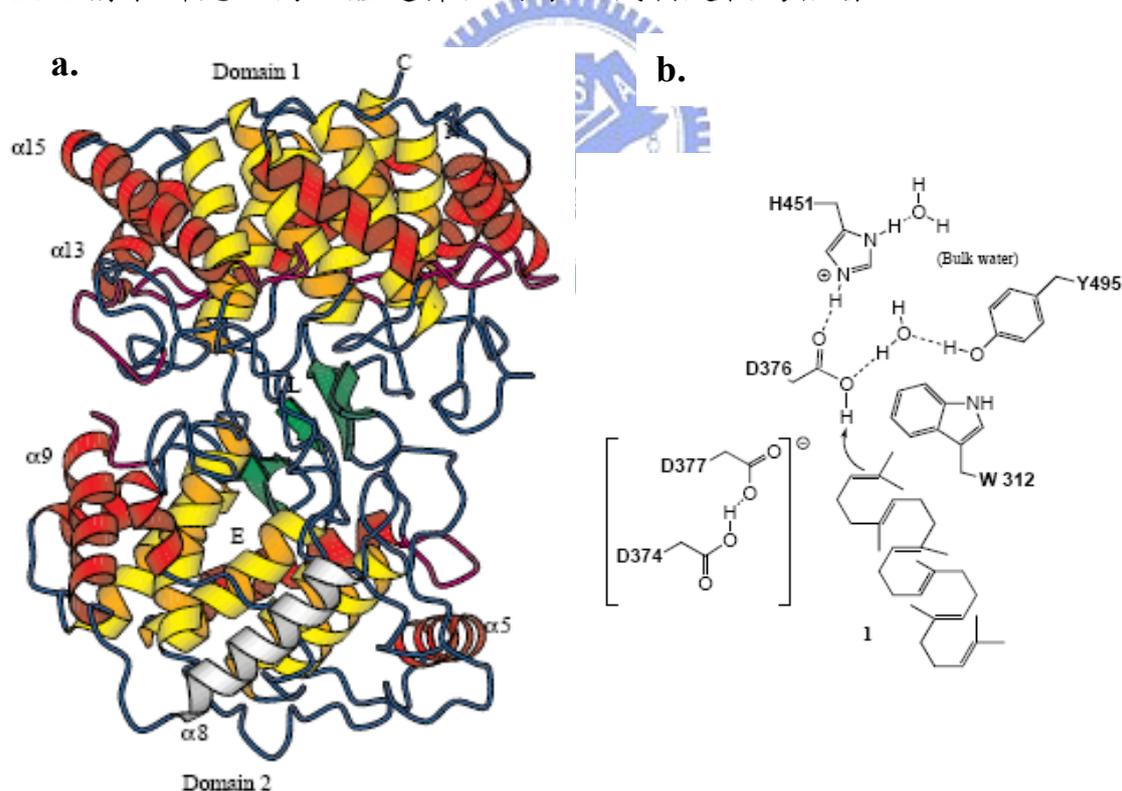


《圖1-14》人類OSC X-ray 晶體結構，圖中黑色處為抑制劑 Ro48-8071，用以指出與受質結合的反應活性位置³⁵



《圖1-15》人類OSC與膜結合時的構形，圖中黑色為抑制劑Ro48-8071 結合在中心反應的活性結合區³⁵

同屬於三萜類環化家族的SHC其X-ray結晶結構也已由Ulrich Wendt於1997年發表在Science期刊《圖1-16a》³⁶。早期的SHC結晶結構常常被用於作為瞭解OSC環化機制的比較模版，但由於SHC的演化程度較早，且其受質為鯊烯而非氧化鯊烯，所以將其作為同源性模組有其限制性。SHC是利用組胺酸-456(Histidine)的殘基來增強Asp376的酸性，進而活化打開雙鍵的起始環化作用《圖1-16b》³⁹，並且藉由SHC Trp169的碳陽離子- π 電子的共振穩定效應，引起D環的擴張，進而引導E環的環化而形成五環的蛇麻烯(Hopene)³⁷。而在先前許多OSC環化機制的研究上，證實了OSC是以氧化鯊烯作為受質，且其B環是以能量較不傾向的船形(Boat form)構形來摺疊，而環化反映在D環形成以後終止³⁸。正因為OSC與SHC在環化機制上的明顯差異，再加上人類OSC與酵母菌OSC的同源性較高，所以利用人類OSC的結晶結構來研究此高立體選擇性的環化機制是較為恰當³⁵。



《圖1-16》 a. SHC之X-ray結晶結構，其中L為抑制劑而E則為受質進入之孔洞³⁶ b. SHC環化起始假設反應機制³⁹

1.3.3 氧化鯊烯-環阿屯醇環化酵素 (CAS)

在高等植物的酯醇生合成途徑中，受質氧化鯊烯會由氧化鯊烯-環阿屯醇環化酵素催化其環化反應物，生成植物固醇的前驅物—環阿屯醇 (Cycloartenol)，進一步的代謝形成最終產物植物固醇 (Phytosterol)。在阿拉伯芥 (*Arabidopsis thaliana*) 中的環阿屯醇環化酵素 (CAS, EC 5.4.99.8) 是由759個胺基酸所組成，分子量為86kDa。

氧化鯊烯-環阿屯醇環化酵素 (CAS) 與氧化鯊烯-羊毛硬脂醇環化酵素 (OSC) 在環化的機制上，除了在脫氫的位置不同外，其他地方基本上均十分相似。兩者都是利用氧化鯊烯作為受質，並且在環化時受質皆會在酵素活性區內以椅形-船形-椅形的方式摺疊，之後並經過一連串類似的環化過程而形成C-20原脂醇碳陽離子中間物，並且有相同的甲基與氫化基轉移機制，只是在進行到最後一步的去質子化步驟時，氧化鯊烯-環阿屯醇環化酵素會催化C-19上的氫行脫除反應而生成環阿屯醇，而氧化鯊烯-羊毛硬脂醇環化酵素則催化C-8上的氫脫除而生成羊毛硬脂醇。另外，學者也發現在兩者的序列比對中，其活性區域內胺基酸基團只有少數相同，因此這些相異性的位置被認為可能造成兩者脫氫位置不同的關鍵性胺基酸。所以目前有許多研究就是針對序列比對上在CAS1與ERG7之間的不同胺基酸序列，利用突變的方式來加以研究其酵素催化機制上的相關性^{64,65}。

從熱力學的觀點來看，環阿屯醇比羊毛硬脂醇較為不穩定，所以學者認為環阿屯醇環化酵素之所以可以將產物環化成為能量較不趨向的環阿屯醇，可能是因為酵素CAS裡的某些特定胺基酸的作用。而在先前對阿拉伯芥環阿屯醇環化酵素 (*AthCAS1*) 的突變實驗中也發現，Tyr410、His477與Ile481在CAS環化機制中扮演著十分重要的角色⁶⁵⁻⁶⁸。這些胺基酸在各物種的CAS中皆具有高度保留的特性，但是在ERG7中則分別以Thr、Cys、Gln及Val的形式存在《圖1-17》。所以這些胺基酸被認為會促進環阿屯醇的形成，因此若將這些胺基酸進

行突變也可以得到羊毛硬脂醇⁶⁷。

AthCAS1	Q	G	Y	N	G	412	T	A	D	H	G	W	P	I	S	D	C	T	485
DdiCAS1	Q	G	Y	N	G	365	T	V	D	H	G	W	P	I	S	D	C	T	437
SceERG7	M	G	T	N	G	386	T	K	T	Q	G	Y	T	V	A	D	C	T	458
SpoERG7	R	G	T	N	G	381	N	I	T	Q	G	Y	T	V	S	D	T	T	453
HsaERG7	Q	G	T	N	G	383	T	L	D	C	G	W	I	V	S	D	C	T	457
RnoERG7	Q	G	T	N	G	384	T	L	D	C	G	W	I	V	A	D	C	T	458

《圖1-17》 Tyr410 (◆), His477 (*) and Ile481 (▼)在CAS1具有高度保留性而在ERG7中則被Thr、Cys、Gln或是Val所取代⁶⁷

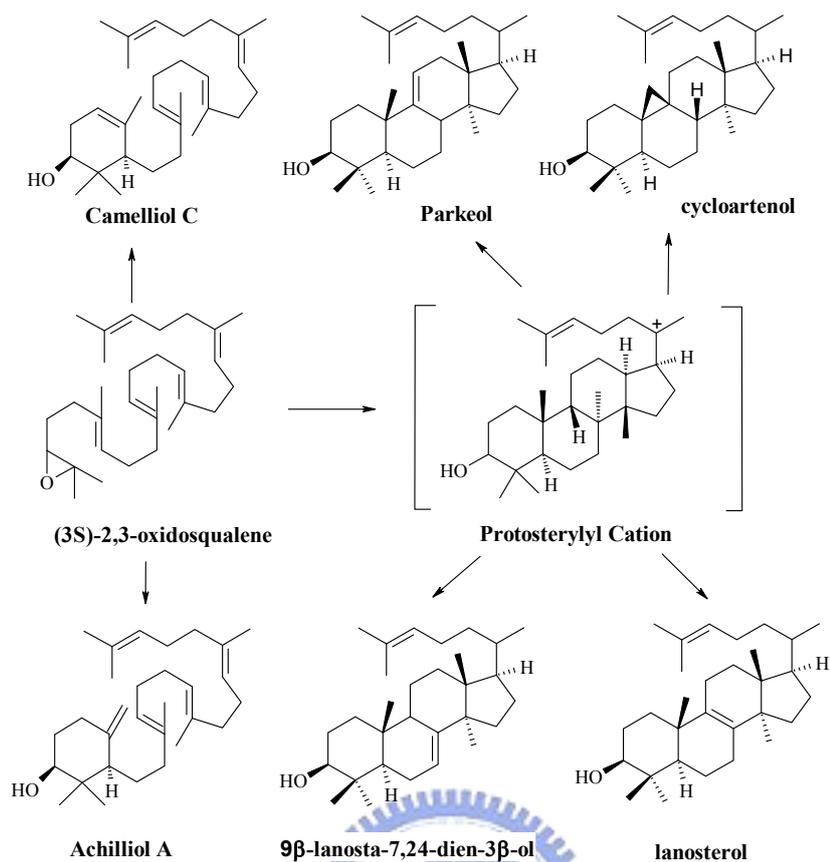
舉例來說，Ile481在所有物種中的CAS皆具有高度保留性，而在ERG7中則為Val《圖1-17》。根據研究結果顯示，Ile481會藉由其 γ 位置的甲基來防止碳陽離子與A環上兩支甲基的交互作用，來促使環阿屯醇的形成。若將Ile481突變成為Val，在產物中可以得到25%的羊毛硬脂醇與55%的環阿屯醇和20%的parkeol。另外，Ile481也被認為會利用其較大的立體空間來幫助受質作正確的摺疊，而如果將其突變成側鏈體積較小的胺基酸（如Ala與Gly）則會得到achilleol A與camelliol C《圖1-18、表1-1》。

在酵素CAS中，Tyr410與His257被認為在靠近C-19的位置會有氫鍵配對的交互作用，因此可以藉此幫助最後的去質子化作用⁶⁷。而在在AthCAS1^{Tyr410Thr}的突變株中，產物會由原本的環阿屯醇變成75%羊毛硬脂醇、24% 9 β -lanosta-7, 24-dien-3 β -ol以及1% Achilleol《圖1-18、表1-1》。另外，若將Tyr410突變成為Thr時，則會減低碳陽離子中間物上方的立體空間障礙，而且由於Thr上的氫氧基團較Tyr更接近 α -碳，因此在AthCAS1^{Tyr410Thr}突變株中，Tyr532與His257的極性基團將會被重新排列，因而造成酵素CAS不會產生環阿屯醇，反而會在C-8/C-9部位上進行脫氫反應而形成羊毛硬脂醇、parkeol與9 β -lanosta-7,24-dien-3 β -ol⁶⁹。

CAS His477雖不位於受質鍵結的活性區域，但是曾有報導指出，位於活行區外圍（second-sphere）的His477會與Tyr410產生氫鍵的交互作用而互相拉扯，進而影響環化機制的最終脫氫反應⁶⁷。His477在所有物種的CAS中皆具有高度保留性，而在ERG7中則會以Gln或Cys取而代之。在*AthCAS1*^{His477Gln}的突變株中，帶有極性的官能基會向C-11移動靠近，造成在C-11位置行脫氫反應而產生parkeol多於羊毛硬酯醇的結果；而在*AthCAS1*^{His477Asn}的突變株中，則會產生大量的羊毛硬酯醇，但由於其胺基酸基團也夠靠近C-11的位置，所以也會產生parkeol⁶⁸。

在整個CAS環化過程中，His257與Asp483被認為是CAS催化活性上所必須的。Asp483被認為會作為一個路易士酸來幫助環氧基的開環，以協助環化的起始作用；His257則被認為是位在活性區域的鹼性基團，能協助C-19上的氫與活性區上的酸基有一質子的來回移動，以幫助在C-19位置上的脫氫作用⁴³。另外在雙定點突變株*AthCAS1*^{I481V/Y410T}中，發現其產生羊毛硬酯醇的比例比較其他定點突變株高出許多；然而在三定點突變株（His477Asn/Gln,Ile481Val,Tyr410Thr）中，因為Thr的氫氧基距離Asn與Gln的氨基過遠，所以並沒有辦法促進羊毛硬酯醇的生成。而經實驗的結果證實，產生羊毛硬酯醇效率最好的突變株為雙定點突變株*AthCAS1*^{H477N/I481V}《表1-1》⁶⁸。

整合上述在植物CAS中的定點突變可以發現，在*AthCAS1*^{H477N}與*AthCAS1*^{I481V}與兩者的雙定點突變株中可以導致植物CAS產生最大量的羊毛硬脂醇。Suzuki等人在2006年時發表了植物羊毛硬脂醇的合成酵素，他們從阿拉伯芥中發現At3g45130可以在植物中合成羊毛硬脂醇，最後名為LAS（lanosterol synthesis）。有趣的是從序列比對中可以發現到LAS在CAS胺基酸His477與I481位置分別被換成Asn與Val，這於CAS中的突變結果不謀而合，也顯示了這兩個胺基酸對於羊毛硬脂醇合成的重要性。



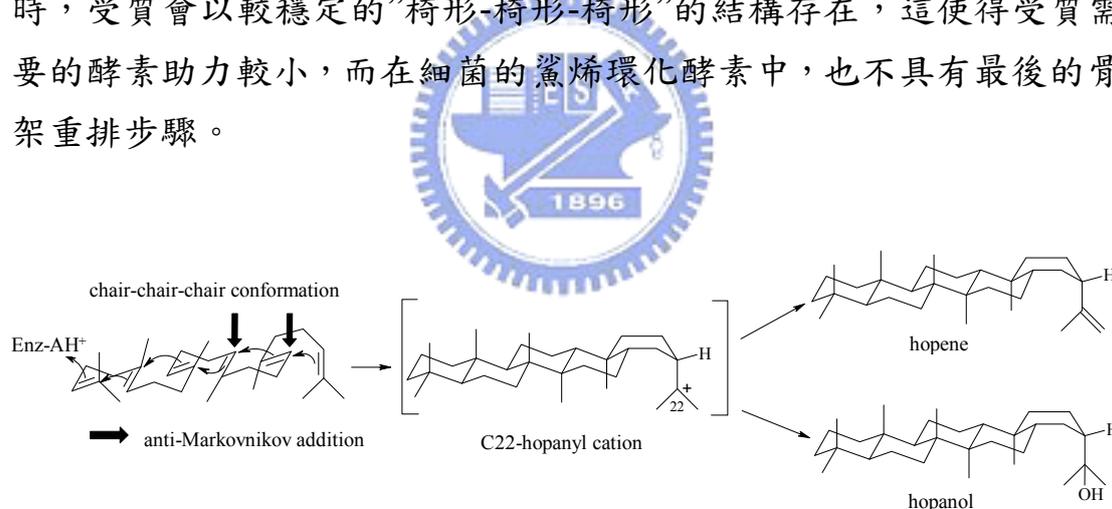
《圖1-18》阿拉伯芥CAS定點突變產物結構圖

<i>AthCAS1</i> mutants	Cycloartenol	Lanosterol	Parkeol	9β-Δ7-Lanosterol	Achilleol A	Camelliol C
CAS1 ^{I481}	99	-	1	-	-	-
CAS1 ^{I481L}	83	1	16	-	-	-
CAS1 ^{I481V}	55	24	21	-	-	-
CAS1 ^{I481A}	12	54	15	-	13	6
CAS1 ^{I481G}	17	23	4	-	44	12
CAS1 ^{Y410T}	-	65	2	33	-	-
CAS1 ^{Y410C}	-	75	-	24	1	-
CAS1 ^{H477N}	-	88	12	-	-	-
CAS1 ^{H477Q}	-	22	73	5	-	-
CAS1 ^{I481V/ Y410T}	-	78	< 1	22	-	-
CAS1 ^{I481V/ H477N/ Y410T}	-	78	-	22	-	-
CAS1 ^{I481V/ H477Q/ Y410T}	-	78	-	22	-	-
CAS1 ^{I481V/ H477N}	-	99	1	-	-	-
CAS1 ^{I481V/ H477Q}	-	94	6	-	-	-

《表1-1》阿拉伯芥CAS定點突變產物及比例分配表⁶⁸

1.3.4 鯊烯-蛇麻烯環化酵素 (SHC)

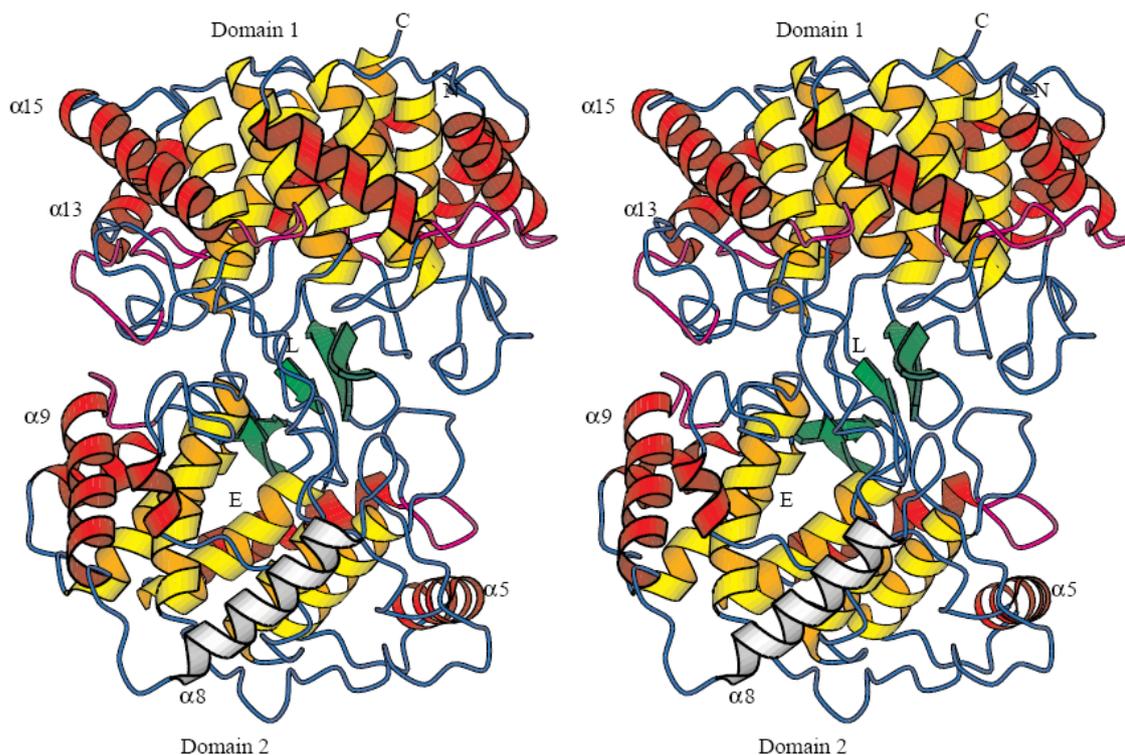
在自然界中，細菌與原生動物並不會產生固醇類，而是以五環的蛇麻烯作為替代。細菌中的鯊烯-蛇麻烯環化酵素 (Squalene-Hopene; SHC) 與OSC、CAS同樣屬於三萜類環化酵素家族，而SHC也與OSC具有類似的環化機制《圖1-19》。從受質的觀點來看，真核細胞的氧化鯊烯環化酵素利用氧化鯊烯作為受質，而細菌的鯊烯環化酵素則是利用鯊烯作為受質，所以鯊烯環化酵素被認為出現在演化過程中較早的厭氧時期。另外，細菌的鯊烯環化酵素對受質的專一性也較低，不僅可以利用鯊烯作為受質，對於氧化鯊烯或是其光學異構物甚至是一般的多萜醇也可以進行反應。相反地，真核的氧化鯊烯環化酵素則具有很高的受質結構專一性。若從環化機制上來觀察，鯊烯環化酵素在反應機制和形態上都是以較簡單的方式進行。當它在進行環化作用時，受質會以較穩定的”椅形-椅形-椅形”的結構存在，這使得受質需要的酵素助力較小，而在細菌的鯊烯環化酵素中，也不具有最後的骨架重排步驟。



《圖1-19》SHC的環化機制與OSC十分類似

在所有三萜類環化酵素中，*A. acidocaldarius* 鯊烯-蛇麻烯環化酵素(SHC, EC5.4.99.x)是最早被結晶出來，並且於1997年Science期刊中發表其X-ray晶體結構、酵素蛋白的活性區域與可能的反應機制³⁶。從其結晶結構上可以發現SHC是一個啞鈴型雙聚體膜蛋白，結構中含有豐富的 α 螺旋 (α -helix)。雖然SHC為膜蛋白，但它並未完全穿透細菌的細胞膜，其受質鯊烯會經由疏水性的孔道進入酵素的活性區域

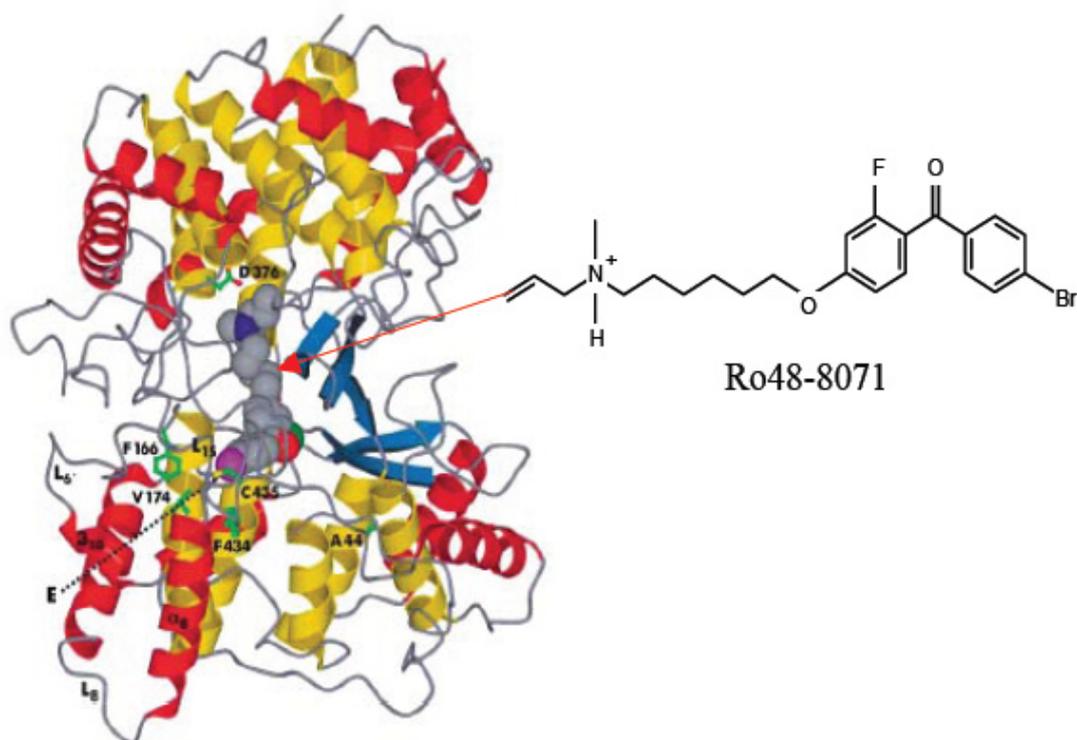
中《圖1-20》。這些結構的資訊，可用作其它同源性環化酵素家族的基本模版，並且提供反應機制與酵素結構功能的研究方向。另外，*A. acidocaldarius*的SHC與人類OSC的重要胺基酸約有20%相同性（Identity），並由於其具有同源性，因此可以透過SHC結構上的相關資訊，來推測OSC的環化過程的機制。



《圖1-20》SHC之X-射線晶體結構圖。C：胺基酸的COOH端；N：NH₂端；L：抑制劑（LDAO）接合位置；E：酵素表面唯一的非極性區域，約為1600Å²並被認為是受質進入的通道（Entrance Channel）。紅色與黃色之滾筒狀緞帶構形為α-Helix的結構；綠色為β結構；紫色為 QW-Motifs 之重複區域³⁶

1998年Abe等人曾經利用固醇類抑制劑Ro48-8071來研究*A. acidocaldarius*中SHC其酵素結構與催化功能的相關性¹⁵。從Ro48-8071在*A. acidocaldarius*的SHC之X-射線晶體結構中與酵素相結合的活性

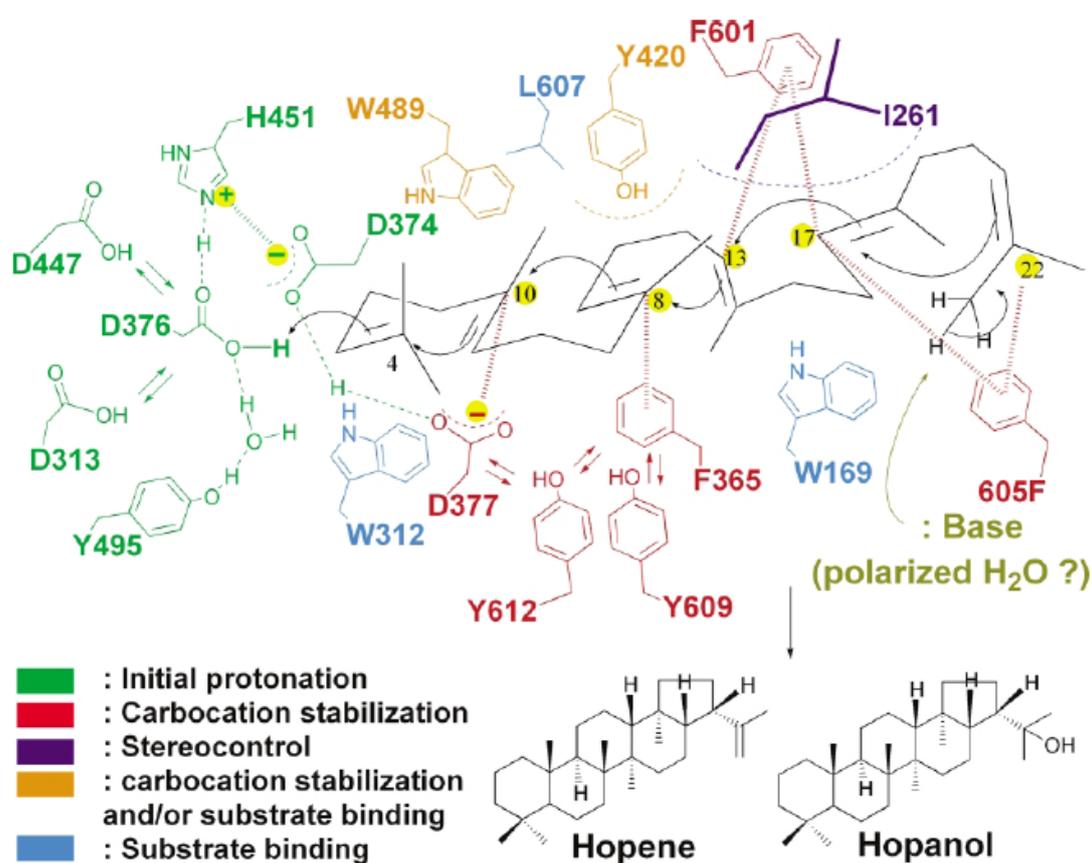
區域位置，以及藉由之前酵素動力學之實驗數據，並可以用來證明SHC與Ro48-8071間的抑制關係，可以發現胺基酸Asp376在酵素中扮演著誘導雙鍵打開質子化的角色，並且會與His451間產生氫鍵作用，另外若加上Tyr495和Asp376與水分子的互相聯繫，增強Asp376所扮演的路易斯酸來協助起始環化反應的角色《圖1-21》。



《圖1-21》藉由目前OSC的抑制劑 Ro48-8071（灰色）與SHC結合的分子模擬圖，證明Asp376為提供質子起始環化反應¹⁵

綜合SHC的結晶結構與定點突變的實驗結果，可以提供我們足夠的證據，來了解酵素在催化反應進行時，活性區內胺基酸與受質鯊烯的交互作用⁶⁴。其中具有芳香族基團特性的胺基酸Trp312與Trp169，被認為可能是與受質的辨識鍵結有關，而Wendt等人則認為這兩個胺基酸會利用其碳陽離子- π 電子的交互作用分別穩定C-4與碳C-13（Hopene編號）的碳陽離子中間物《圖1-22》^{39,64}。同樣地，Trp489也被認為會利用其碳陽離子- π 電子的交互作用穩定A環的形成⁷¹。從

結晶結構來看，儘管Tyr609的位置在C-8附近，但Tyr420仍然被認為具有穩定C-8碳陽離子中間物的功能。因為在定點突變的實驗中，將Tyr420突變成Ala與Gly時，會得到雙環與三環的產物；另外，Tyr420也被認為會利用其立體空間的結構來幫助蛇麻烯骨架在B與C環的結構中進行排列⁷⁰。在酵素SHC中的Phe605位置除了在空間中十分靠近E環外，其在所有的SHC也具有高度保留性，然而在OSC並不具有這個胺基酸，所以Phe605被認為是蛇麻烯E環形成的關鍵³⁹。



《圖1-22》 SHC活性區域內假設活性胺基酸的位置與功能⁷¹

1.4 (氧化) 鯊烯環化酵素之胺基酸序列比對

從序列比對的結果我們可以知道，酵母菌ERG7和人類OSC及細菌的SHC三者約只有40%的相似度，但它們在結構、立體選擇性與催化機制上都具有很高的相似性。因此學者們認為這些環化酵素家族催化生成高度產物的特異性主要是由於下列原因所造成的：(1) 有嚴格的反應機制。反應受質必須結合至酵素上正確的受質結合區，以促使受質排列成特殊的結構。(2) 在環化過程中會產生許多具有高能量的碳陽離子中間產物。(3) 活性區內的芳香族胺基酸會利用碳陽離子- π 電子的交互作用來穩定過渡態的中間產物，因此可以預防早期環化重組的過程被截斷，以確保產物的順利生成³⁸。

從生物演化的觀點來看，若不同物種間的序列會彼此保留相同的胺基酸，則此胺基酸可能是在生物體中具備重要功能且不可或缺，所以才會在不同物種中都被高度保留下來。相反地，較不重要的胺基酸則會隨物種的需要而產生變異或者根本被剷除掉，所以這些差異可以幫助我們了解酵素的環化機制。為了探求進一步的資訊，我們利用相似功能的同一家族酵素其胺基酸序列比對，進而得知彼此間的相同性、相似性及性質相近之胺基酸在比對序列時其排列之相對應位置，因而可以用來探討酵素在結構上與功能上的相關性。

而《圖1-23》則列出環化酵素家族的蛋白質序列比對，其中包含：*A. acidocaldarius* 的SHC、阿拉伯芥 (*A. Thaliana*) 之CAS、阿拉伯芥 (*A. Thaliana*) LAS與酵母菌 (*S. cerevisiae*) 之OSC及人類 (*H. sapiens*) 之OSC《圖1-23》。

Hs_ OSC -----MTEGTC---LRRRGGPYKTEPATD LGRWRLN-CERGRQTWTYLQD 41
Sc_ OSC -----MTEFY S---DTIG-----LPKTD PRLWRLRTDELGRESWEYLTP 36
At_ LAS MWRLK LSE GDE---ESVNQHVG RQFW EYD NQFGTSEERHHINH LRSNFTL 47
At_ CAS MWK LKIAE G GSPWLR TTNHVG RQFW EFD PNLGTPEDLAAVEEARKSFSD 50
Aa_ SHC -----

Hs_ OSC ERAGREQTGLEAYALGLDTKN--YFKDL P KAH-----TAFEGAL 78
Sc_ OSC QQAANDPPSTFTQWLLQDPK---FPQPH P ERNKHSPDF-----SAFDACH 78
At_ LAS NRFSSKHSSDLLYRFQCWKEKKGMERL P QVKVKEGEERLINEEVNVTL 97
At_ CAS NRFVQKHSADLLMRLQFSREN-LISPVL P QVKIEDTDD--VTEEMVETTL 97
Aa_ SHC -----MAEQ LVEAP-----AYAR TL 15

Hs_ OSC N-GMTFYVGLQ AED-GHWTGDYGGPL FLLPGLLI TCHVARIP---LPAGY 123
Sc_ OSC N-GASFFKLLQ EPDSGI FPCQYKGP MFM TIGYVAVNYIAGIE---IPEHE 124
At_ LAS RRSLRFY S I L Q S Q D - G F W P G D Y G G P L F L L P A L V I G L Y V T E V L D G T L T A Q H 146
At_ CAS KRGLDFY STI Q A H D - G H W P G D Y G G P M F L L P G L I I T L S I T G A L N T V L S E Q H 146
Aa_ SHC DRAVEYLLS C Q K D E - G Y W W G P L L S N V T M E A E Y V L L C H I L D R V D ---RDR 60

Hs_ OSC REEIVRYLR SVQ LP-DGGWGLH I E D K S T V F G T A L N Y V S L R I L G V G P D --D 170
Sc_ OSC RIELIRYIVNTAHPVDGGWGLHSVDKSTVEGT VLN Y V I L R L L G L P K D --H 172
At_ LAS QIEIRRYLYNHQNK-DGGWGLHVEGNSTMFCTVLSYVALRLMGEELDGGD 195
At_ CAS KQEMRRYLYNHQNE-DGGWGLHIEGPSTMF GSVLN Y V T L R L L G E G P N D G D 195
Aa_ SHC MEKIRRYLLHEQRE-DGTWALYPGGPPDLDTTIEAYVALKYIIGMSRD--E 107

Hs_ OSC PDLVRARNILHKKGGAVAI PSWGKFWLAVLN VY SWEGLNTLFP EMWLF PD 220
Sc_ OSC PVCAKARSTLLRLGGAIGSPHWKTIWLSALNLYKWEGVNPA P P E T W L L P Y 222
At_ LAS GAMESARSWIHHHGGATFIPSWGKFWLSVLGAYEWSGNNPLPPELWLLPY 245
At_ CAS GDMEKGRDWILNHGGATNITSWGKMWLSVLGAFEWSGNNPLPPEI WLLPY 245
Aa_ SHC EPMQKALRFIQSQGGIESSRVFTRMWLALVGEY PWEKVMPV P P E I M F L G K 157

Hs_ OSC WAPAHPSTLWCHCROVYLPMSYCYAVRLSAAEDPLVQSLRQELYVEDFAS 270
Sc_ OSC SLPMPHGRWVWHTRGVYIPVSYLSLVKFSCEPMTPLLEELRNEIYTKPFDK 272
At_ LAS SLPFH PGRM WCHCRMVYLPMSYLYGRRFV CRTNGTILSLRRELYTIPYHH 295
At_ CAS FLPIHPGRM WCHCRMVYLPMSYLYGKRFGPITSTVLSLRKELFTVPEYHE 295
Aa_ SHC RMP LNIYEF GSWARATVVALSIVMSRQPVE P L P E R A R V P --E L Y E T D V P P 205

Hs_ OSC IDWLAQRNNVAPDELYTPHSWLLRVVYALLNLYEHHHS-----AHLRQRA 315
Sc_ OSC INFskNRNTVCGVDLYYPHSTTLNIANSLSLVVFYEKYL RN----RFIYSLs 318
At_ LAS IDWDTARNQCAKE DLYYPHPKIQDVLWSCI NKFGEPLLERWPLNNLRNHA 345
At_ CAS VNWNEARNLCAKE DLYYPHPLVQDILWASLHKIVEPVL MRWPGANLREKA 345
Aa_ SHC RRRGAKGG-----GGWIFDALDRALHGYQKLSVHP-----FRRAA 240

Hs_ OSC VQKLYEHIVADDRETKSISIGPI SKTINMLVRWYVDGPASTAFQEHVSRI 365
Sc_ OSC KKKVYDLIKTE LQNTDSL CIAPV NQAFCA LVTLIEEGVDSEAFQRLQYRF 368
At_ LAS LQTVMQHIHYEDONSHYICIGPVNKV L NMLCCWVES-SNSEAFKSHLSRI 394
At_ CAS IRTAIEHIHYEDENTRYICIGPVNKV L NMLCCWVED-PNSEAFKLHLPRI 394
Aa_ SHC EIRALDWLLERQAGDGSWGGI QPPWFYALIALKILDMTQHPAFIKGWEGL 290

Hs_ OSC PDYLWMLDGMKMQGTNGSQIWDTAFAIQALL EAGGHRPEFSSCLQKAH 415
Sc_ OSC KDALFHGPQGMTIMGTNGVQTWDCAFAIQYFFVAGLAERPEFYNTIVSAY 418
At_ LAS KDYLWVAEDGMKMQGYNGSQLWDVTLAVQATLATNLVD--DYGLMLKKAH 442
At_ CAS HDFLWLAEDGMKMQGYNGSQLWDTGFAIQATLATNLVE--EYGPVLEKAH 442
Aa_ SHC ELYGVELDYGGWVFQASISPVWDTGLAVLALRAAGLPAD---HDRLVKAG 337

Hs_ OSC EFLRLSQVPDNPPDYQK-YRQMRKGGFSFSTLDCGWIVSDCTAEALKAV 464
Sc_ OSC KFLCHAQF--DTECVPG-SYRDKRKGAWGFSTKTQGYTVADCTAEALKAI 465
At_ LAS NYIKNTQIRKDTSGDPGLWYRHPCKGGWGFSTGDNPPVSDCTAEALKAA 492
At_ CAS SFVKNSQVLEDCPGDLNYWYRHISKGAWPFSTADHGWPI SDCTAEGKAA 492
Aa_ SHC EWLLDRQIT--VPGDWAVKRPNLKPGGFATQFDNVYYPDVDDTAVVWVAL 385

Hs_ OSC LLLQEK--CPHVTEHTIPRERLCDAVAVLLNMRNPD---GGFATYETKRG 508
Sc_ OSC IMVKNSPVFSEVHHMISSE RLFEGIDVLLNLQNGSFEYGSFATYEKIKA 515
At_ LAS LLLSQMP-VNLVGEPMPEEHLVDVNFILSLQKN---GGFASYELTRS 537
At_ CAS LLLSKVP-KAIVGEPIDAKRLYEAVNVITISLQAD---GGLATYELTRS 537
Aa_ SHC NTLRLPD-----ERRRRDAMTKGFRWIVGMQSSN---GGWGAYDVDNT 425

Hs_ OSC GHLLLELLNPSEVFGDIMIDYTYVECTSAVMQALKYFHKRFPEHRAAEIRE 558
Sc_ OSC PLAMETLNP AEVFGNIMVEYPYVECTDSSVLGLTYFHKYF-DYRKEEIRT 564
At_ LAS YPELEVINPSETFGDIIIDYQYVECTSAAIQGLVLF TTLNSSYKRKEIVG 587
At_ CAS YPWLELINPAETFGDIVIDYYPYVECTSAAIQALISFRKLYPGHRKKEVDE 587
Aa_ SHC SDLPNHIPFCD-FG-EVTDPPSEDVTAHVLECFG-----SFGYDDAWK 466

```

Hs_ OSC      TLTQGLEFCRRQQRADGSWEGSWGVCFTYGTWFGLEAFACMGQTYRDGTA 608
Sc_ OSC      RIRIAIEFIKKSQLPDGSWYGSWGI CFTYAGMFALEALHTVGETYEN--- 611
At_ LAS      SINKAVEFIEKTQLPDGSWYGSWVCFTYA TWFGIKGMLASGKTYES--- 634
At_ CAS      CIEKAVKFIESIQAADGSWYGSWAVCFTYGTWFGVKGLVAVGKTLKN--- 634
Aa_ SHC      VIRRAVEYLKREQRPDGSWFGRWGVNYLYGTGAVVSALKAVGIDTREP-- 514

Hs_ OSC      CAEVSRACDFLLSRQADGGWGEDFESCEERRY--LQSAQSQIHNTCWAM 656
Sc_ OSC      SSTVRKGCDFLVSKQMKDGGWGESMKSSE LHSY--VDSEKSLVVQTAWAL 659
At_ LAS      SLCIRKACGFLLSKQLCCGGWGESYLSQONKVYTNLPGNKSHIVNTSWAL 684
At_ CAS      SPHVAKACEFLLSKQQPSGGWGESYLSQDKVYSNLDGNRSHVVNTAWAM 684
Aa_ SHC      --YIQKALDWVEQHQNPDGGWGEDCRSYEDPAY--AGKGASTPSQTAWAL 560

Hs_ OSC      MGLMAVRHPDIE--AQERGVRCLLEKQLPNGDWPQENIAG-VFNKSCAIS 703
Sc_ OSC      IALLFAEYPNKE--VIDRGIDL LKNRQEESEGEWKVESVEG-VFNHSCAIE 706
At_ LAS      LALIEAGQASRDPMPLHRGAKSLINSQMEDGDYPQQEILG-VFNRCMIS 733
At_ CAS      LALIGAGQAEVDRKPLHRAARYLINAQMENGDYFQQEIMG-VFNRCMIT 733
Aa_ SHC      MALIAGGRAESE--AARRGVQYLVETQRPDGGWDEPYTGTGTFPGDFYLG 608

Hs_ OSC      YTSYRNIFFPIWALGRFSQLYPERALAGHP 732
Sc_ OSC      YPSYRFLFPIKALGMYSRAYETHTL----- 731
At_ LAS      YSAYRNIFFPIWALGEYRKLMLSL----- 756
At_ CAS      YAAYRNIFFPIWALGEYRCQVLLQQGE--- 759
Aa_ SHC      YTMYRHVFPFTLALGRYKQAIERR----- 631

```

《圖 1-23》人類 OSC (*H. sapienes* OSC ; Hs_ OSC)、酵母菌 OSC (*S. cerevisiae* OSC ; Sc_ OSC)、阿拉伯芥 LAS (*A. thaliana* LAS ; At_ LAS)、阿拉伯芥 CAS (*A. thaliana* CAS ; At_ CAS) 與細菌 SHC (*A. acidocaldarius* SHC ; Aa_ SHC) 序列比對圖

從不同的環化酵素家族其蛋白質序列比對中，可以發現到一段獨特的胺基酸序列：Q-W 活性功能區域 (Q-W Motif)，其序列常為 [(K/R)(G/A) X₂₋₃ (F/Y/W)(L/I/V) X₃QX₂₋₅GXW]。此功能區域在 SHC 中有八次的重複而在 OSC、CAS 中則有五次重複出現⁴²《圖 1-24》。早期學者認為 Q-W Motif 與酵素進行環化反應過程中，在鍵的斷裂與生成時所引起的放熱反應的以及焓 (enthalpy) 有關，另外也可能藉由這些功能區域中具有高度保留性的 Tyr 與 Trp，利用其富含 π 電子軌域的側鏈與高能量的碳陽離子中間物產生碳陽離子- π 電子的交互作用 (cation- π interaction) 來穩定這些中間產物。而此推測也符合 Griffin 所提出的 Aromatic Hypothesis 的理論模組³⁴。

然而，在 SHC 的 X-ray 結晶結構被解出來以後，卻發現到 Q-W Motif 並不位於酵素的活性區域上，而是位於酵素的表面。這些具有高度保留性的胺基酸會透過氫鍵與疏水性的交互作用和 α 螺旋結構進行鍵結，而 Wendt 等人也認為酵素是利用這些交互作用來穩定本身的結構，避免被環化過程中所釋放的能量所破壞。所以 Q-W Motif 近年來已被證實並不全部與環化機制有關，反而多是認為其作為穩定酵素結構的胺基酸的功用。

OSC (H.S.)	QW6	79	NGMTFYVGLQAEDGHW	94
OSC (S.c.)	QW6	79	NGASFFKLLQEPDSGIF	95
SHC (A.a.)	QW6	17	RAVEYLLSCQKDEGYW	32
CAS (A.t.)	QW6	99	RGLDFYSTIQAHDGHW	114
OSC (H.S.)	QW5	127	EIVRYLRSVQLPDGGW	142
OSC (S.c.)	QW5	127	ELIRYIVNTAHPVDGGW	143
SHC (A.a.)	QW5c	63	KIRRYLLHEQREDGTW	78
CAS (A.t.)	QW5	139	EMRRYLYNHQNEDEGGW	164
SHC (A.a.)	QW5b	243	RALDWLLERQAGDGSW	258
SHC (A.a.)	QW5a	335	KAGEWLLDRQITVPGDW	363
SHC (A.a.)	QW4	402	KGFRWIVGMQSSNGGW	417
OSC (H.S.)	QW3	561	TQGLEFCRRQQRADGSW	577
OSC (S.c.)	QW3	568	IAIEFIKKSQLPDGSW	583
SHC (A.a.)	QW3	470	RAVEYLKREQKPDGSW	485
CAS (A.t.)	QW3	591	KAVKFIESIQAADGSW	606
OSC (H.S.)	QW2	614	RACDFLLSRQMADGGW	629
OSC (S.c.)	QW2	617	KGCDFLVSKQMKDGGW	632
SHC (A.a.)	QW2	518	KALDWVEQHQNPDGGW	533
CAS (A.t.)	QW2	640	KACEFLLSKQPPSGGW	655
OSC (H.S.)	QW1	672	RGVRCLEKQLPNGDW	687
OSC (S.c.)	QW1	675	RGIDLLKNRQEESEGW	690
SHC (A.a.)	QW1	576	RGVQYLVETQRPDGGW	591
CAS (A.t.)	QW1	702	RAARYLINAQMENGDF	718

《圖 1-24》Q-W Motif 在環化酵素家族內之分佈情形 *H. sapienes* OSC (*H.s.* OSC) ; *S. cerevisiae* OSC (*S.c.* OSC) ; *A. acidocaldarius* SHC (*A.a.* SHC) ; *A. thaliana* CAS (*A.t.* CAS)

1.5 研究目的

氧化鯊烯環化酵素在三萜類生合成途徑中扮演著十分重要的角色，由於其在生理及演化上的重要性，因此酵素的環化機制與其胺基酸基團所具有的功能，一直是近年來科學家十分感興趣的研究課題。研究蛋白質結構與功能的方法主要有下列兩種：核磁共振光譜 (Nuclear Magnetic Resonance, NMR) 及蛋白質 X-ray 單晶繞射 (Protein X-ray Crystallography, X-ray diffraction)。但上述兩種方法皆有所限制，核磁共振光譜只能夠解出分子量較小的蛋白質 (小於 30kDa); 而在進行 X-ray 單晶繞射之前則必須先純化出一定數量的蛋白質，但是在利用蛋白質進行結晶試驗時，養晶的條件往往複雜不易拿捏。而且，我們所研究的氧化鯊烯環化酵素是一種膜蛋白，分子量而且十分不穩定且不容易被純化，所以我們無法利用上述兩種方法來得到氧化鯊烯環化酵素的結構與催化機制間的關係。目前在研究酵母菌 ERG7 最常見的方式包括利用生物資訊學的方式加以研究其催化機制與抑制劑間的探討，另外也會利用序列比對，透過同源物種的結晶結構來模擬探討其催化機制⁶⁴。

隨著 1997 年細菌的 SHC³⁶ 與 2004 年人類的 OSC³⁵ X-ray 結晶結構的解讀，提供了我們更多對酵母菌 ERG7 的了解，特別是人類 OSC 的結晶結構。透過這些資訊我們可以知道受質在酵母菌 ERG7 整個環化過程中會經過十幾個鍵的斷裂與生成，最後經由甲基與氫化基的轉移，然後在不同的地方進行脫氫反應。在環化的過程中，酵素活性區域的胺基酸基團扮演著辨識受質、穩定中間產物等等十分重要的功能，所以近年來科學家也針對活性區域內的假設活性胺基酸進行了許多突變實驗的研究。

在酵素催化機制的研究中，利用突變的技術研究蛋白質功能上的變化或影響，已經是蛋白質工程及分子生物技術中，一種很常被應用的方法，而最常見的方法為定點突變與隨機突變。定點突變通常是針

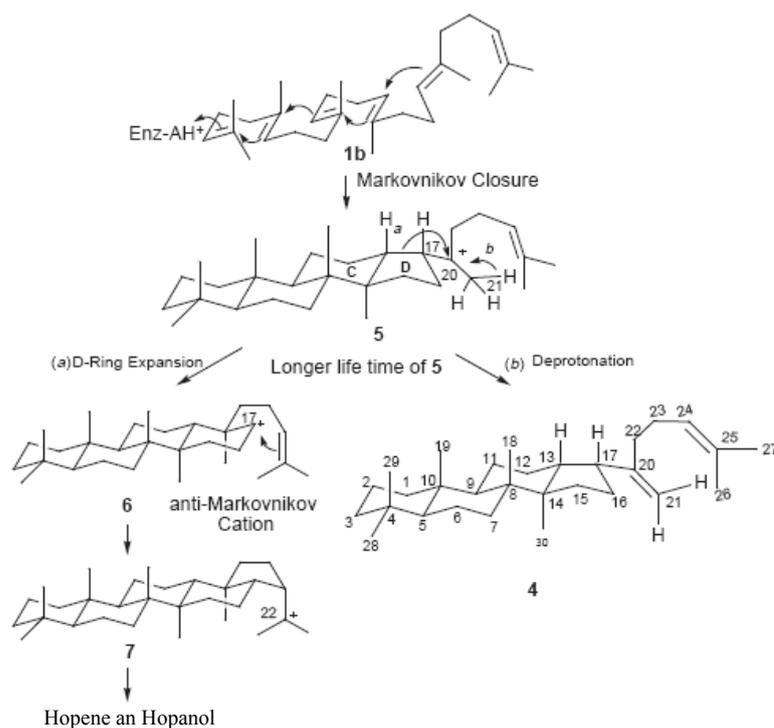
對某個位置的胺基酸進行取代、刪除或嵌入，用以探討某個重要區段上特定胺基酸序列所執行的功能。而隨機突變是對蛋白質上的胺基酸序列不預設位置地進行突變效應探討，通常一開始並不知道被突變的位置，且突變的量之大而需建構成一個突變株庫 (library)，再設計篩選方式從中挑選出所要的突變株。

透過胺基酸序列比對我們可以發現到許多在 SHC 與 OSC 間都被保留下來的芳香族胺基酸，而近年來科學家也對這些胺基酸進行了許多突變實驗來驗證其所具有的功能。例如 Sato 等人在 1998~2000 年間對細菌 SHC 許多芳香族胺基酸進行了定點突變與酵素動力學的實驗，在這些實驗中他們發現若將 Trp312 (對應到酵母菌 ERG7 為 Trp390；人類 OSC 為 Trp387) 突變成 Leu 則會造成酵素失去活性；而若突變成胺基酸 Phe，則 K_m 值會增加約 3.5 倍， V_{max} 值則沒有改變《表 1-2》。所以 Sato 等人根據酵素動力學結果，假設 Trp312 在細菌 SHC 中可能扮演著受質辨認的角色，而辨認受質的引力可能是藉由芳香環上的 π 電子軌域與受質上甲基的 C-H 鍵形成的 CH- π 交互作用 (CH- π interaction)，或是利用芳香環上的 π 電子軌域與受質雙鍵互相堆疊而形成的引力來辨認受質。另外，他們認為將 Trp 突變成 Phe 會使酵素 K_m 值增加的原因，可能是由於 Phe 相對於 Trp 而言 π 電子密度較低而且較為鬆散才會使得 K_m 值增加，也就是受質較不容易鍵結⁷³。若從 SHC 結晶結構來看，Trp312 則被認為會與提供質子開環的胺基酸 Asp376，或和其周圍的 Asp374、Asp377 互相有交互作用而影響開環反應⁷⁴；而 Thoma 也由人類 OSC 結晶結構結果觀察認為 Trp387 會藉由其側鏈中的苯環，並利用其碳陽離子- π 電子的共振作用來穩定 C-6 與 C-10 的碳陽離子中間物《圖 1-12》³⁵。

SHC	$K_m(\mu M)$	$V_{max}(\text{nmol} / \text{min} / \mu g)$	$V_{max}/K_m(\times 10^3)$	Relative activity(%)	Optimal Temp.(°C)	Specific activity at optimal temp.
Wild-type	16.7	0.090	5.39	100.0	60	100
W312L*	—	—	—	0	—	0
W312F	55.1	0.082	1.49	27.6	54	19.8
W489L*	—	—	—	0	—	0
W489V*	—	—	—	0	—	0
W489F	91.9	0.013	0.14	2.6	53	2.9

《表 1-2》SHC 活性區域內胺基酸酵素動力學實驗結果⁷³，其中*代表利用大量蛋白質(1.5mg)進行實驗仍然沒有活性的胺基酸突變株

另一方面在人類 OSC 中，Trp581 (對應於酵母菌 ERG7 為 Trp587；細菌 SHC 為 Trp489) 是另外一個被 Thoma 等人認為可以穩定 C-6 與 C-10 的碳陽離子中間物的芳香族胺基酸《圖 1-12》³⁵。而在 Sato 等人對細菌的 SHC 所進行的一連串酵素動力學實驗中發現，若將 Trp489 突變成為 Leu 與 Val 都會造成酵素完全失去活性；若突變成同為芳香族的胺基酸 Phe 時，受質的 K_m 值則增加為野生型的約 5.5 倍但其 V_{max} 值則減為原本的七分之一，且相對活性只有 2.6%《表 1-2》⁷³。Sato 等人根據上述結果認為，Leu、Val 會使酵素失去活性，而受質的 K_m 值增加則表示 Trp489 在細菌 SHC 中有著辨認受質的作用，且其中作用力跟 Trp312 一樣，可能是經由與 C-H 鍵形成的 CH- π 交互作用，或是利用芳香環上的 π 電子軌域與受質的雙鍵所互相堆疊形成的引力來辨認受質；另外受質的 V_{max} 值降低則顯示酵素催化能力的降低，所以酵素可能需要 π 電子軌域來穩定高能量的碳陽離子中間物，而將 Trp 突變成 Phe 同時則會造成 π 電子軌域密度降低且較為鬆散，才會使得 V_{max} 值降低⁷³。同時在 1998 年，Sato 等人也對 Trp169 與 Trp489 進行定點突變的產物分析。其結果從 Trp169 突變成 Phe、His 與 Trp489 突變成 Phe 的突變株中，可以發現到符合馬可尼可夫法則的 6-6-6-5 圓環的四環產物生成《圖 1-25》⁷⁵。



《圖 1-25》在 Trp169 與 Trp489 突變點中所得 6-6-6-5 四環產物的產物途徑推測圖⁷⁵

在酵素 OSC 的整個環化反應中，四個環全部形成以後會進行兩支甲基與氫化基轉移的骨架重排反應，最後才會在正確的位置進行脫氫反應。而在這個過程中除了四個環的形成時，酵素需要特殊的胺基酸來穩定高能量的碳陽離子中間物外，在骨架重排與脫氫反應中同樣需要胺基酸來穩定之。在人類 OSC 的結晶結構中有許多胺基酸被認為用來穩定骨架重排的反應過程，Phe521（對應到酵母菌 OSC 為 Phe528；細菌 SHC 為 Phe437）就是其中之一³⁵；而在細菌 SHC 中，Phe437 也被認為具有類似的功能³⁶。另外，Phe521 還位於人類 OSC 受質進入孔道的環狀胺基酸區域中（環狀區域胺基酸為 516 到 524 區段與 697 到 699 區段），這也更增加了其在酵素中的重要性。

綜合以上所述人類 OSC 與細菌 SHC 的各項實驗結果與結晶結構，我們推測酵母菌 ERG7 的這三個胺基酸 Trp390、Trp587 與 Phe528 可能也在酵母菌中具有十分重要的功能。由於目前在各種酵母菌

ERG7 突變點中，已經得到單環、三環與四環產物卻唯獨缺少了雙環產物，而從細菌 SHC 與人類 OSC 的結晶結構中我們可以推測 Trp390 與 Trp587 除了在辨認受質上具有一定重要性以外，可能也具有穩定 C-6 或 C-10 的高能碳陽離子的能力，也就是說這兩個胺基酸可能對於 A 環與 B 環的形成十分重要，所以我們期望可以在這兩個胺基酸的突變株中得到雙環的產物。因此我們在整體實驗上首先利用人類 OSC 的結晶結構作為模版，模擬酵母菌 ERG7 中其活性區域內假設性的活性區域胺基酸位置，並發現上述三個胺基酸的位置並沒有太大改變。接下來我們會利用飽和定點突變的方式，將這三個胺基酸突變成另外十九種胺基酸，並且對這三個胺基酸進行突變產物的分析，再利用電腦模擬的方式，觀察突變過後周圍重要胺基酸的相對應位置是否有改變，來研究這三個胺基酸所具有的功能並協助我們了解酵母菌 ERG7 的催化機制。我們選用的研究策略如《圖 1-26》所示，進一步的實驗步驟與研究結果將在後面章節加以論述。



實驗流程



《圖 1-26》實驗流程圖

第二章 實驗材料與方法

2.1 實驗材料

2.1.1 化學藥品與材料

Acetic anhydride

Adenine

Ampicillin sulfate

D-Sorbitol

Ergosterol

Glucose

Histidine

Lysine

Methioine

Pyridine

Tryptophan

Uracil

以上皆購自於 Sigma



Acetic acid

Acetone

95% Ethanol

Anisaldehyde

Dichloromethane

Ethyl acetate

Ethylenediamine-tetraacetic acid (EDTA)

Ether

Glycerol

Hemin Chloride

Hexane

Methanol

Potassium hydroxide

Pyrogallol

Sea sand

Silica gel

Silver nitrate

Sodium sulfate

Sulfonic Acid

TLC plate

Tween 80

以上皆購自於 Merck

Agarose-LE

Bromophenol blue

Tris base

以上皆購自於 USB



Bacto™ Agar

LB Broth, Miller

Trypton

Yeast Extra

Yeast Nitrogen Base w/o amino acid

以上皆購自於 DIFCO

DNA 10Kb Ladder

Primers

以上皆購自於 Bio Basic Inc., Canada

Dimethyl sulfoxide 購自於 MP Biomedicals

G418 購自於 Gibco

dNTP Set, 100mM Solutions 購自於 GE Healthcare
Restriction enzyme 購自於 New England BioLabs Inc.
SYBR[®] Green I 購自於 Roche

2.1.2 實驗套組

BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit 購自於 Applied Biosystems
GFX[™] PCR DNA and Gel Band Purification Kit 購自於 GE Healthcare
Plasmid Miniprep Purification Kit 購自於 GeneMark
QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit 購自於 Stratagene Inc., La Jolla, CA

2.1.3 菌珠與載體



XL1-Blue :

為大腸桿菌 *E. coli* 之一株，購自於 Stratagene 公司。

CBY57 :

為酵母菌 *S. cerevisiae* 的一種菌株，其基因型為 MATa *ERG7*Δ:: *LEU2* *ade2-101 his3-Δ200 leu2-Δ1 lys2-801 trp1-Δ63* [pZS11]，可供菌株選殖篩選之用。另外，此菌中含有質體 pZS11，其帶有 *ERG7* 基因可用來彌補酵母菌體中 *ERG7* 的基因缺陷。

TKW14C2 :

亦為酵母菌 *S. cerevisiae* 之菌株 其基因型為 MATa or MATα *ERG7*Δ:: *LEU2 ade2-101 his3-Δ200 leu2-Δ1 lys2-801 trp1-Δ63 ura3-52 hem1*Δ::Kan^R)，可供菌珠選殖篩選用。

載體 RS314：

購自於 New England BioLabs 公司。載體 RS314 是一種可穿梭於酵母菌 *S. cerevisiae* 和大腸桿菌 *E. coli* 間的載體 (Shuttle Vector)，帶有選擇性標記 *Trp1*。

2.1.4 培養液與緩衝液

Ampicillin stock solution (100mg/mL)

將 Ampicillin 溶於二次去離子水，再用 0.2 μ M 濾膜過濾，去除雜菌，儲存於 -20 $^{\circ}$ C。

50X TAE buffer

2 M Tris acetate，0.1 M EDTA，pH 8.5，儲存於室溫，以一次水稀釋 50 倍使用。



50X ALTHMU solution

0.2% Adenine, 0.3% Lysine, 0.2% Tryptophan, 0.2% Histidine, 0.2% Methonine, 0.2% Uracil 溶解於一次水，經高壓滅菌後儲存於 4 $^{\circ}$ C。

50X ALHMU solution

0.2% Adenine, 0.2% Lysine, 0.2% Histidine, 0.2% Methonine, 0.2% Uracil 溶解於一次水，經高壓滅菌後儲存於 4 $^{\circ}$ C。

50 X ALTHU：

0.2% Adenine，0.3% Lysine，0.2% Tryptophan，0.2% Histidine，0.2% Uracil，經高壓滅菌後存於 4 $^{\circ}$ C。

50 X ALTU：

0.2% Adenine，0.3% Lysine，0.2% Tryptophan，0.2% Uracil，經高壓滅菌後存於 4 $^{\circ}$ C。

50 X ALT :

0.2% Adenine、0.3% Lysine、0.2% Tryptophan 經滅菌後存於 4 °C。

50% Glucose solution

500g Glucose 溶解於一公升的一次水中，經高壓滅菌後儲存於 4°C。

80% Glycerol solution

80 ml Glycerol 溶解於 20 ml 的一次水，經高壓滅菌後儲存於 4°C。

LB medium

25g LB Broth 溶解於一公升的一次水中，經高壓滅菌後儲存於 4°C。

LB plate

25g LB Broth 與 20g Bacto™ Agar 溶解於一公升的一次水中，經高壓滅菌後倒入於 Petri dishes 中待其凝固。

G418 stock solution (1g/mL)

500mg G418 溶解於 500μl 經高壓滅菌之二次水，避光保存於 4°C。

SD medium

6.7g Yeast nitrogen base 溶解於一公升的次水中經高壓滅菌後儲存於常溫。

20% EA developing solution

將 Ethyl acetate 與 Hexane 以 1 : 4 互相混合。

TLC staining solution

緩慢的將 95% Ethanol、Sulfonic Acid 與 *p*-Anisaldehyde 以 18 : 1 : 1 之比例混合。

1M sorbitol solution

364.4g D-sorbitol 溶解於一公升的一次水中，經高壓滅菌後儲存於 4°C。

5X sequencing buffer

取 4.85g 的 Tris base 與 0.203g 的 MgCl₂ 溶於 100 ml 的一次水中並調至 pH 9.0，保存於 4°C。

10X SYBR Green solution

以 DMSO 稀釋 10,000X SYBR Green stock solution 至 10X，避光保存於 -20°C。

6X DNA loading dye

0.25% Bromophenol blue 與 30% Glycerol 溶解於一次水中，保存於 -20°C。



Heme solution

在無菌環境下將 0.5g Hemin chloride 溶解於 250ml 0.2N 的氫氧化鈉溶液中，再加入 250ml 95%酒精後避光保存於室溫。

Ergosterol solution

在無菌環境下將 1g Ergosterol 溶解於 250ml 95%的酒精中，再加入 250ml Tween 80，避光保存於室溫。

ALHMU/Heme/Ergosterol plate

將 0.67g yeast nitrogen base 與 2g Bacto™ Agar 溶解於 100ml 的一次水中，經高壓滅菌後加入 2ml 50X ALHMU solution、4ml 50% Glucose solution、2ml Heme solution、2ml Ergosterol supplement solution 與 100μl G418 stock solution。於無菌環境下混合均勻後倒入 Petri dishes 待其凝固，避光保存於 4°C。

2.1.6 實驗儀器

水浴槽 (Baxter, Durabath™ Water Bath)

電源供應器 (GE healthcare, Electrophoresis Power Supply EPS 301)

掃描器 (EPSON, EPSON® GT-7000 Scanner)

微量旋轉式真空濃縮機 (EYELA, Rotary vacuum evaporator N-N series)

數位照相系統 (Kodak, DC120 Kodak Electrophoresis Documentation and Analysis System 120)

震盪培養箱 (Firstek Scientific, Orbital shaking incubator Model-S302R)

PCR (Perkin Elmer, GeneAmp PCR System 9700)

紫外光/可見光光譜儀 (Beckmann, DU 7500 Spectrophotometer)

高速離心機 (Beckmann, Allegra 21 Series)

電泳槽 (GE Healthcare, Hoefer® HE 33 Mini Horizontal Submarine Unit)

DNA 定序儀 (PerkinElmer, ABI Prism 377 DNA Sequencer)

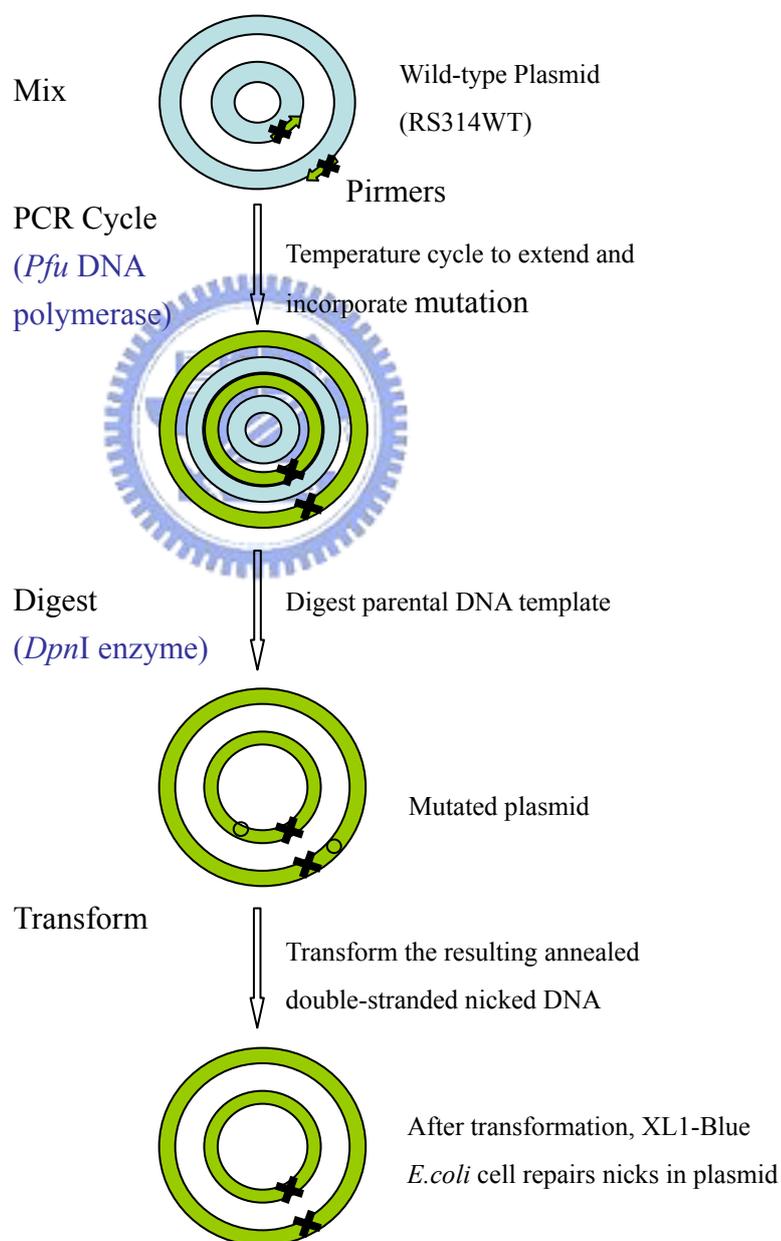
脈衝控制器 (BioBad, Pulse Controller)



2.2 實驗方法

2.2.1 重組質體的建構 (The construction of recombinants)

利用 Stratagen 公司所出品的 QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit 建構質體。先設計含有飽和定點突變與靜默突變之互補引子。再以含有正常功能的 ERG7 序列之載體 RS314WT 作為模板，利用 QuikChange PCR 的方法 (圖 2-1)，建構飽和定點突變之質體。



《圖 2-1》 QuikChange Site-Directed Mutagenesis 示意圖。

(1) 設計引子

在下表中，將所要突變之胺基酸以灰色網底表示，其中 N 代表 A、T、C 與 G。另外，我們會在突變點之前建構一個靜默突變 (Silent mutation)，藉此設計一個切位 (以下標線表示之) 作為酵素鑑定之用。其餘引子於附錄一詳述。

YTL-OSCW390X - <i>Kpn</i> I 1	5' -CCA TTA Tgg gTA CCA ATg gTg TgC AAA CCN NNg ATT gTg Cg- 3' <i>Kpn</i> I
YTL-OSCW587X - <i>Bam</i> H I 1	5'- ggT ATg gAT CCN NNg gTA TTT gTT TTA CAT ATg C -3' <i>Bam</i> H I
YTL-OSCF528X - <i>Pvu</i> II 1	5'-CTT gAA TCC AgC TgC TgA AgT TNN Ngg TAA CAT AAT gg -3' <i>Pvu</i> II

《表 2-1》飽和定點突變之引子設計



(2) QuikChange Site-Directed Mutagenesis

利用 Stratagene 公司 (Merck 代理) 所出品的 QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit，按照下表所列之溫度條件進行聚合酶連鎖反應來建構飽和定點突變之質體 DNA。

reagent	Volume(μl)
Template	0.5
Primer1 (1000ng/μl)	0.5
Primer2 (1000ng/μl)	0.5
10X <i>pfu</i> Buffer	2
dNTP (2.5mM)	1.6
DDW	14.5
<i>Pfu</i> polymerase	0.4

《表 2-2》QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit 所用的材料條件

segment	cycles	temperature	time
1	1	95°C	2 min
2	25	95°C	30 sec
		53°C	1 min
		68°C	4min
3	1	68°C	5min
4	1	4°C	∞

《表 2-3》 QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit 所使用之聚合酶素放大程式

(3) *Dpn* I 酵素切除母股 DNA

將 PCR 產物以下表之條件放置在水浴槽中於 37°C 下反應四個小時，因 *Dpn*I 限制酶具有截切甲基化 DNA 之特性，因此我們可以用其去除不含有突變之母股 DNA。

reagents	Volume (μl)
PCR products	16
10× NE Buffer 4	2
<i>Dpn</i> I	2

《表 2-4》 *Dpn* I 酵素切除母股 DNA 產物處理材料條件

(4) 突變質體的放大與酵素鑑定

(A) 製備勝任細胞

取少許 XL1-Blue 在含有 Tetracycline (100 mg/L) 的 LB Agar 培養皿上劃四區，於 37°C 培養箱一天後。由 Tetracycline/ LB Plate 上挑取單一菌落培養於含有 Tetracycline (100 mg/L) 的 3 ml LB 試管，同樣在 37°C 下於培養箱隔夜培養。接著將菌液接種於 1,000 ml 的 SOB 培養液 (含有 0.02 M 的 MgCl₂)，於震盪培養箱中以 37°C、250 rpm 震盪條件培養 4 至 5 小時使其 OD₆₀₀ 介於 0.5 至 0.6 之間。將菌液置於經高壓滅菌過

之離心瓶中，並冰浴十分鐘，接著在4°C下以4,100 rpm的條件離心十分鐘，待去除上清液之後以經高壓滅菌過之二次水清洗pellet，冰浴十分鐘後，再以4,100 rpm、4°C條件離心十分鐘。去除上清液後，以320 ml TB buffer清洗pellet，並重複上述條件離心之。倒除上清液後，以80 ml TB buffer重新懸浮菌體，繼而加入5.6 ml的DMSO冰浴十分鐘。取350 µl菌液於經高壓滅菌後的微量小管中，丟入液態氮急速冷凍，最後保存於-80°C冰箱即可。

(B) 質體 DNA 的轉殖與放大

從-80°C冰箱中取出勝任細胞於冰上緩慢解凍，取10 µl含有突變點之質體DNA，並加入100 µl的勝任細胞，冰浴20分鐘使質體DNA附著於細胞的表面。置於42°C的水浴一分鐘，使細胞表面因熱產生小孔洞而促使質體DNA進入細胞內。冰浴一分鐘後將菌液加入於1 ml的LB試管中，以37°C、200 rpm震盪條件培養一小時後，將菌液以8,000 rpm的條件離心一分鐘並去除上清液，接著在無菌環境下將菌液塗在LB plate (with Ampicillin 100mg/l)，在37°C下培養約16小時後，挑取單一菌落培養於3 ml的LB tube (with Ampicillin 100mg/l)，於37°C、200 rpm震盪條件下培養12小時即可抽取放大之質體DNA。

(C) 限制酶鑑定

將放大抽取所得之含有突變的質體 DNA，依下表所示之條件以所設計之限制酶與特定緩衝液混和，並置於 37°C 水域槽中反應三小時，再以 DNA 電泳來確定質體是否含有所設計之突變點。

reagents	Volume (μ l)
Plasmid	0.5
10 \times NE Buffer	1
Enzyme	0.5
DDW	8

《表 2-5》特定限制酶鑑定之材料條件

(5) 突變質體的定序

將上述經由限制酶鑑定過之含有突變的質體 DNA 以 Sanger Method (dideoxynucleotide chain termination) 進行定序。首先利用 BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit 以下表所示之材料條件下進行聚合酶連鎖反應，其引子列於附錄一。在反應過後以酒精沈澱法取得 DNA，再以 ABI PRISM 3100 auto-sequencer 進行定序反應。

reagents	Volume (μ l)
Template	2
5X Sequencing Buffer	4
Primer	1.5
DDW	11.5
BigDye 3.1	1

《表 2-6》BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit 所用之材料

segment	cycles	temperature	time
1	1	95 $^{\circ}$ C	2 min
2	25	96 $^{\circ}$ C	10 sec
		50 $^{\circ}$ C	5 sec
		60 $^{\circ}$ C	4 min
3	1	4 $^{\circ}$ C	∞

《表 2-7》BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit 所用之溫度

2.2.2 酵母菌株 TKW14C2 與 CBY57 的電穿孔作用

(1) TKW14C2

於-80°C 冰箱中取出 TKW14C2 菌株，由於 TKW14C2 不具有正常的 ERG7 功能 (即不含有 *ERG7* 基因) 且 *Heme* 基因已被置換掉，因此培養液需要額外補充 Hemin + Ergosterol + Met (胺基酸 Methionine 在體內的生合成與 *Heme* 基因相關，當 *Heme* 基因被置換掉時，Methionine 的生合成會受影響，故要額外補充)。將其接種於 3 ml 的 SD (with ALTHMU/ hemin/ Ergosterol/ Glucose) 試管在 30°C 後以 250 rpm 震盪條件培養約三天。繼而將菌液倒入 100 ml 含有相同培養液條件下培養至其 OD₆₀₀ 值介於 1 至 1.5 之間，後將全部菌液以 3,000 rpm 於 4°C 條件下離心十分鐘，去除上清液後以經高壓滅菌之二次 (50 ml) 緩慢沖洗菌體。重複上述離心步驟後以 20 ml 經高壓滅菌之二次水沖洗菌體。再重複上述離心步驟，倒除上清液並以 4 ml 經高壓滅菌之冰過的 1M D-sorbitol 溶液緩慢沖洗菌體。同樣地，再以 3,000 rpm 於 4°C 條件下離心十分鐘並倒除上清液。最後加入 50 μl × n (n 為所需轉殖的樣品數目) 之 D-sorbitol 溶液。之後取 50 μl 菌液混和 5 μl 含有突變之質體 DNA，並於 4°C 下冰浴 5 分鐘。接著將混合液置入 2 mm 的電穿透玻璃管，設定玻璃管入脈衝控制器條件為 1.5 kV，200 Ω，25 μF 以進行電穿透作用。在電擊後立刻加入 500 μl 無菌的 1M D-sorbitol 溶液將細胞懸浮混勻，最後取 120 μl 的菌液塗佈在 SD plate 中 (with ALHMU/ Hemin/ Ergosterol/ Glucose)，於 30°C 恆溫箱中培養 3 至 5 天待其菌落生長即可進行功能性補充篩選分析。

(2) CBY57

於-80°C 冰箱中取出 CBY57 菌株，接種於 3 ml 的 SD(with ALTH/ Glucose) 試管中在 30°C、250 rpm 震盪條件下培養約三天後，將菌液倒入 100 m 含相同培養液的條件下培養至其 OD₆₀₀ 值介於 1 至 1.5 之間。其餘步驟同上述 TKW14C2 作法，但最後需將菌液塗佈在 SD plate (with ALH/ Glucose) 上。

2.2.3 功能性補充活性篩選

(1) 麥角固醇補充篩選

將先前以電穿孔方式轉殖入酵母菌TKW14C2之菌株培養皿取出，於其上挑取單一菌落，並依序劃眉於以下兩組培養皿上：Glucose + ALHMU + Hemin (實驗組) 與 Glucose + ALHMU + Hemin + Ergosterol (對照組)。利用外界補充麥角固醇與否，得以篩選出哪些突變株會使酵素失去ERG7正常的催化功能，並藉此分析那些突變位置在ERG7催化機制上具有重要影響性。另外需與下列反向篩選的結果做對照，接著將具有重要影響的突變ERG7酵母菌進行大量培養，以獲得突變株得產物圖譜。

(2) 質體交換與反向篩選

從電穿孔轉殖作用的培養皿中挑取含有突變之單一 CBY57 菌落，於 3 ml SD (with ALHU/ Glucose) 中 30°C、250 rpm 震盪條件培養一天。取少量菌液依序劃眉於以下兩組培養皿：SD + Glucose + Ade + Lys + His + Ura (對照組) 與 SD + Glucose + Ade + Lys + His + Ura + 5-FOA (實驗組) 並於 30°C 培養三至五天。由於含 pZS11 的質體無法在含 5-FOA 的環境中生長；因此，能於 SD + Ade + Lys + His + Ura + 5-FOA (實驗組) 選擇性培養皿上生長的含突變 ERG7 重組質體之

酵母菌，即表示此突變株仍具有 ERG7 功能，可補足 CBY57 中缺少 ERG7 之環化酵素的功能。若重組質體中之突變 ERG7 功能其基因不具有功能性，即無法生長在 SD + Ade + Lys + His+ Ura+ 5-FOA（實驗組）之選擇性培養皿上，代表著突變位置會影響正常的 ERG7 環化功能，因而導致無法生成下游產物以供菌株生長，透過此種反向的篩選方式，初步篩選哪些突變位置在 OSC 催化機制上具有重要的影響性。

2.2.4 酵母菌的培養

從麥角固醇補充篩選培養皿上挑取含有突變之菌落，並接種於 3 ml 的 SD 中（with ALHMU/ Hemin/ Ergosterol）於 37°C、250 rpm 震盪條件下培養約五天。將試管底部菌體重新懸浮均勻，再把菌液到入 100 ml 無菌之相同培養液並於同樣環境下培養二至三天。同樣地，將菌體懸浮均勻後置入 2.5 L 經高壓滅菌過之相同培養液，在 37°C 下震盪培養一個禮拜即可。



2.2.5 非皂化脂質的萃取

將培養一個星期之酵母菌於 4°C、6,000 rpm 條件下離心十分鐘，再以 15% KOH 與 0.1% Pyrogallol 溶液重新懸浮細胞，接著加入等體積之 95%酒精，並於 110°C 下進行兩個小時熱迴流（Reflux）反應。此方法是利用高溫強鹼來打破酵母菌，並以 Pyrogallol 去除掉可皂化之脂質。之後加入三倍體積之石油醚萃取非皂化性脂質（NSL），收集有機層後加入無水硫酸鈉以去除水分並且過濾。接著利用旋轉真空濃縮機乾燥收集產物，等待進行管柱層析。

2.2.6 管柱液相色層分析 (Silica Gel Column Chromatography)

本方法是利用矽粉 (silica gel) 作為管柱中的固相態，另外使用不互溶之極性溶液乙酸乙酯 (Ethyl acetate ; EA) 作為流動相之沖提液 (Eluent)，利用幫浦施壓並不斷添加沖提液，使樣品中的化合物依極性不同而分佈於兩相之間，再利用 TLC 片將相同 Rf 值之試管溶液收集在一起，以迴旋濃縮機濃縮後即可利用 GC/MS (氣相層析/質譜儀) 作進一步分析，詳細步驟如下。

首先將適量矽粉與 100 ml 的正己烷互相混和攪拌均勻後，倒入管柱中填充管柱並以幫浦壓實緊密。接著將樣品溶於二氯甲烷 (CH_2Cl_2) 中，在不破壞矽粉層表面情況下小心加入管柱中。接著以 5.5% EA 與 94.5% Hexane 混合液作為沖提液，並以幫浦加壓將流出之溶劑依序以 50 根試管收下，再用 TLC 片將其相同 Rf 值之試管收集即可以迴旋濃縮機濃縮。



2.2.7 薄層色層分析 (Thin Layer Chromatography)

將試管中的樣品各取 500 μl 於微量小管中，利用真空乾燥機抽乾溶劑。裁取適當大小之表面附有矽粉的玻璃薄層平版，利用少許二氯甲烷回溶樣品後，接著以毛細管將樣品點於平版邊緣約 0.5 公分處，為了獲得最佳之分離效率，這些斑點應該要具有最小之直徑。之後利用 20% 乙酸乙酯 (EA) 混和 80% 正己烷做為展開劑進行平板展佈。平板展佈 (Plate Development) 是利用流動相載送樣品流經靜相的一種過程；此種過程與液相層析法的沖提過程是具有相同意義，皆是利用極性不同來分離其中之化合物。首先，將平板置入一只呈現展佈溶劑之飽和蒸氣態的密閉容器中，平板一邊浸入展佈溶劑中，但必須小心以避免樣品與展佈劑有直接接觸。展佈溶劑會藉著在顆粒之間的毛細管作用力，而沿著平板往上移動。當展佈溶劑到達樣品施用之斑點

時，它會溶解樣品，並將樣品往上載送，而樣品自身則在移動之溶劑與靜相之間進行分佈行為。當展佈劑移動至距離平板頂端約 0.5 公分時，可將平板從容器中移出，並予以乾燥。最後我們利用顯色溶液會與有機化合物形成深色產物之特性，將平板浸泡於顯色溶液中並置於加熱版 (Hot plate) 上加熱顯色，即可利用 TLC 片對分析物進行定位分析。

2.2.8 氣相層析/質譜儀 (GC/MS) 的條件

氣相層析儀使用 Agilent 6890N 型號，管柱選用 Agilent 122-5731 DB-5HT (30 m × 0.25 mm ; 0.1 μm film)，注射口氣化溫度設定為 250 °C，以不分流 (Splitless) 方式進行，氣體供應源為氦氣 (He Gas)，烘箱 (Oven) 條件為起始溫度 50 °C，持續 1 分鐘，之後以每分鐘 10 °C 方式上升至最終溫度 300 °C，並持續 8 分鐘，總時間為 34 分鐘，搭配質譜 (MS) 儀做為訊號偵測器。MS 使用 Agilent Technologies Model 5973 MSD 型號，程式設定為溶劑延遲偵測 7 分鐘，掃描範圍 50 ~ 550 Da，質譜離子供應源溫度設定為 230 °C。

2.2.9 突變電腦模擬圖的建構

本模擬圖是利用國家高速網路中心 (www.nchc.org.tw) 中化學資料庫與應用程式之 Insight II 程式計算模擬所得。首先進入 Insight II 分子模擬程式後，在 Molecule 子選單中點選 Get 指令，選擇 pdb 格式，將預備當骨架之人類 OSC 酵素之三維結構點利用 excute 功能鍵叫出。選擇 Homology 模組，點選 Sequence 子選單的 Extract 指令，即可將人類 OSC 胺基酸序列以另一視窗表示。再用 Sequence 子選單的 Get 指令將待模擬的 ERG7 胺基酸序列叫出，選擇 Alignment 功能鍵將此二蛋白質胺基酸序列做基本之比對 (Pairwise_Sequence)。點選 Modeler 子選單內之 Modeler_Run 功能鍵即可取得 ERG7 的模擬 3D 結構。

第三章 實驗結果與討論

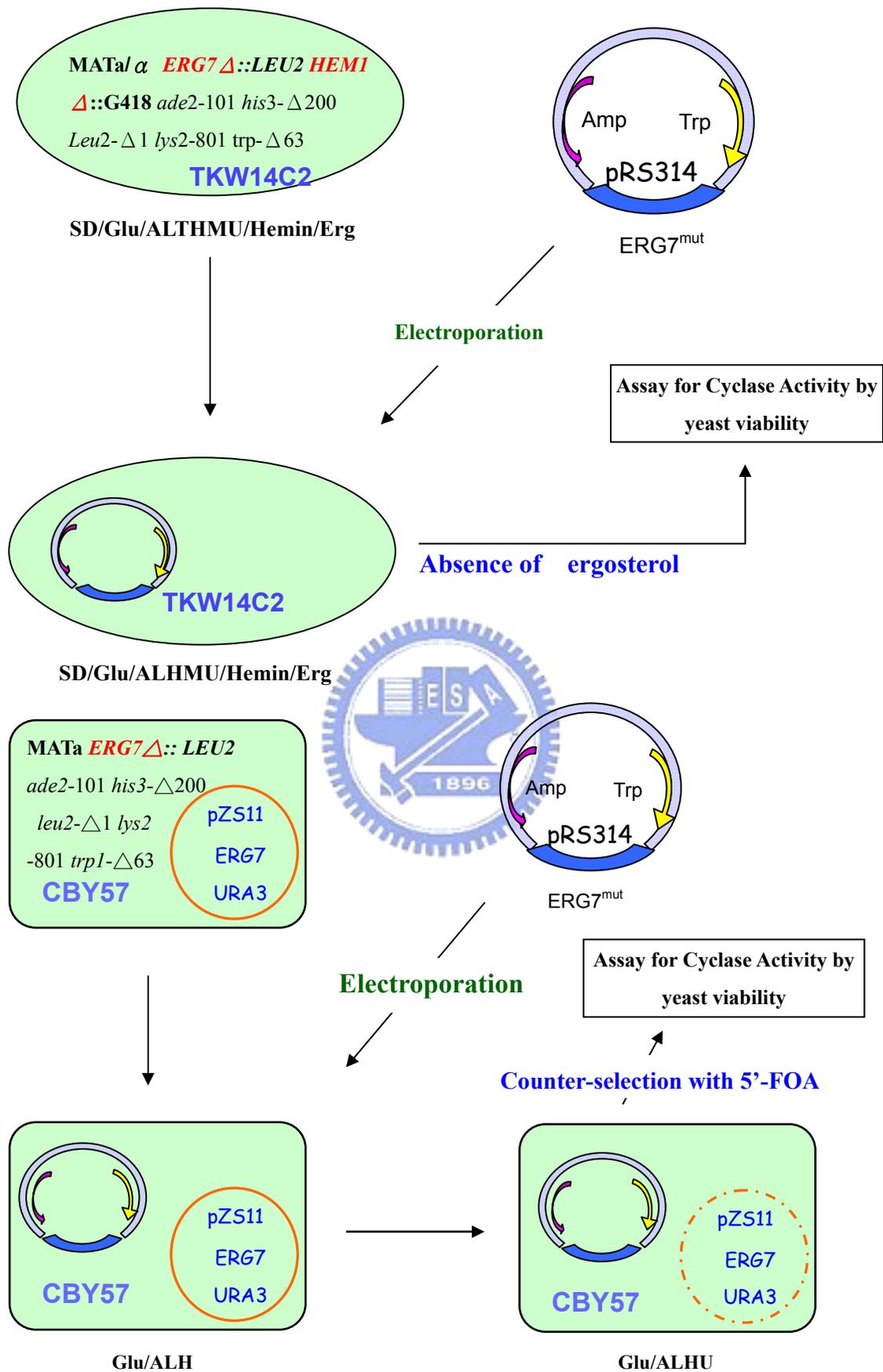
3.1 酵母菌 $ERG7^{W390X}$ 功能性分析

3.1.1 建構 $ERG7^{W390}$ 的定點飽和突變株

要建構酵母菌 $ERG7^{Trp390}$ 的定點飽和突變株，首先必須設計一組進行聚合酶連鎖反應時所需要的引子。設計引子時，我們將所要突變的胺基酸位置 (Trp390) 設計成隨機的序列 (即 NNN)，用以建構隨機突變株的其他 19 種胺基酸。同時，我們在序列前端設計一個靜默突變 (Silent mutation)，這樣的設計讓我們在放大突變質體後，可以先利用限制酵素來鑑定突變質體的正确性。接下來我們利用已經建構好含有野生型 $ERG7$ 基因的質體 pRS314 $ERG7$ 作為母股，並以所設計的引子對進行聚合酶連鎖反應。

3.1.2 $ERG7^{W390X}$ 突變株功能性補充篩選

建構完質體之後，我們利用電穿孔的方式將質體分別轉殖到酵母菌 TKW14C2 ($MATa$ or $MAT\alpha$ $ERG7\Delta::LEU2$ $hem1\Delta::G418$ $ade2-101$ $his3\Delta-200$ $leu2-\Delta1$ $lys2-801$ $trp1-\Delta63$ $ura3-52$) 與 CBY57 ($MATa$ $ERG7\Delta::LEU2$ $ade2-101$ $his3-\Delta200$ $leu2-\Delta1$ $lys2-801$ $trp1-\Delta63$ [pZS11]) 中。將質體轉殖到這兩株酵母菌中主要的目的是為了利用宿主本身基因的缺陷，分別進行麥角固醇補充篩選 (Ergosterol supplement) 與反向篩選 (Counter-selection) 《圖 3-1》。藉由這兩個功能性篩選可以初步辨別經由突變後，胺基酸的置換對於環化酵素是否有重要的影響《表 3-1》。由功能性篩選的表中，我們可以發現當 Trp390 位置換成所有的帶有正電荷的胺基酸 (His、Lys 與 Arg) 時都會導致酵素的失活；此外 Gly、Ile、Met 與 Pro 的取代也會使得菌株死亡，利用此一篩選方式可找出對於 Trp390 在 $ERG7$ 環化的機制中，扮演關鍵性角色的胺基酸取代。



《圖 3-1》麥角固醇補充篩選（上圖）與反向篩選（下圖）示意圖

Substitutions for Trp390		Enzyme mapping	Ergosterol supplement	Counter-selection
Aliphatic group	Gly(G)	✓	—	—
	Ala(A)	✓	+	+
	Val(V)	✓	+	+
	Leu(L)	✓	+	+
	Ile(I)	✓	—	—
Acidic and amide group	Asp(D)	✓	+	+
	Asn(N)	✓	+	+
	Glu(E)	✓	+	+
	Gln(Q)	✓	+	+
Basic group	His(H)	✓	—	—
	Lys(K)	✓	—	—
	Arg(R)	✓	—	—
Hydroxyl-group	Ser(S)	✓	+	+
	Thr(T)	✓	+	+
Sulfur-containing	Cys(C)	✓	+	+
	Met(M)	✓	—	—
Aromatic group	Phe(F)	✓	+	+
	Tyr(Y)	✓	+	+
Imino	Pro(P)	✓	—	—

《表 3-1》酵母菌 ERG7^{W390X} 功能性篩選表

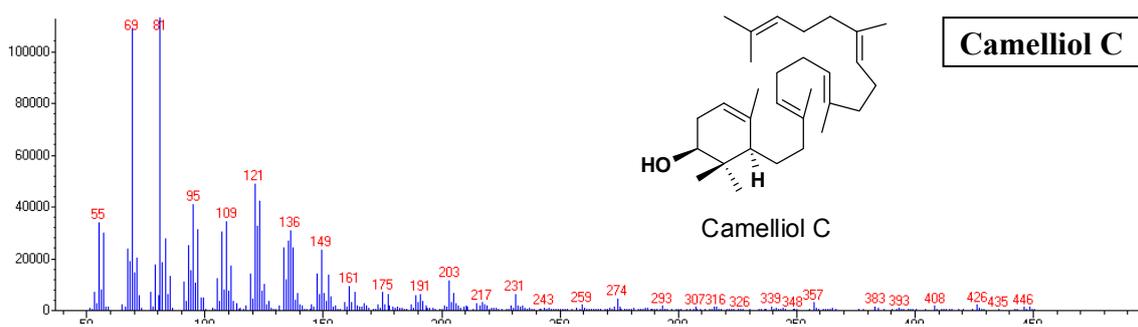
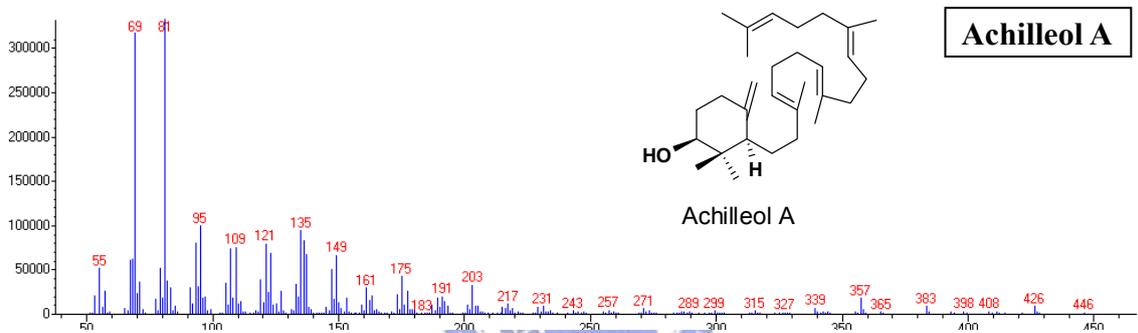
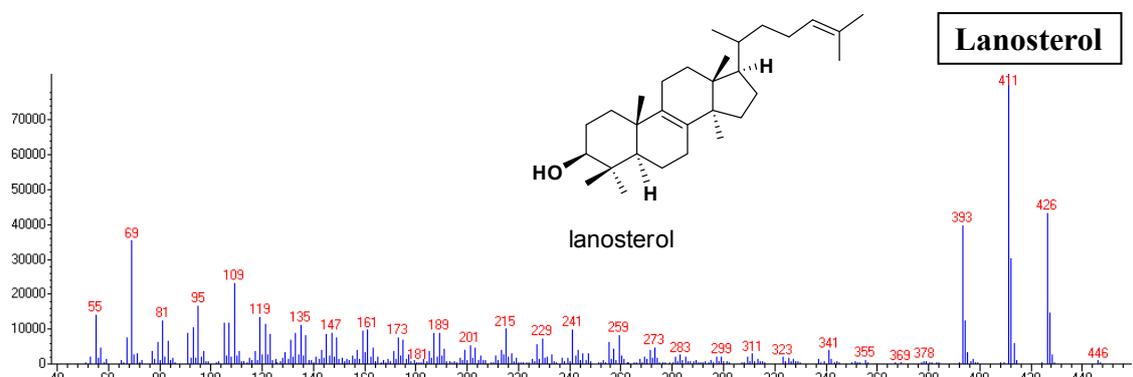
3.1.3 ERG7^{W390X} 突變株產物分析

經過功能性的篩選後，我們從麥角固醇補充篩選的培養皿上挑取菌株，並培養到含有 2.5 L 的 SD 培養液 (SD with Glucose/Heme/ALHMU) 錐形瓶中培養約一個星期，若為致死的突變株則需外加麥角固醇以維持其菌株生長。接著利用加熱與強鹼的方式打破菌體，並經由石油醚萃取後，留下非皂化性脂質 (Nonsaponifiable lipid; NSL)，再透過矽膠管柱層析方法與薄膜層析法來分層萃取並濃縮出目標產物。最後將產物溶解於少量的二氯甲烷 (CH_2Cl_2) 中並由 GC-MS 來鑑定產物《圖 3-2》與決定各產物比例《表 3-2》。

對照《表 3-1》與《表 3-2》我們可以發現在七個會使酵素失去活性的突變點中，有三個胺基酸取 (Ile、Met 與 Pro) 都會產生少量的單環產物 Achilliol A，其中 Pro 還會產生另一個單環的 Camelliol C，不過它們的產量都十分微量；另外在三個致死的帶正電荷胺基酸取代 (His、Lys 與 Arg) 還有 Gly 則是完全沒有得到產物。而在其餘的胺基酸取代中除了 Glu、Cys 與 Tyr 的 Achilleol A 產量較羊毛硬脂醇多以外，產物大部分是以羊毛硬脂醇為主。我們由產物分析的結果來看，在所有的突變點中所產生的產物除了羊毛硬脂醇以外，還有兩個單環產物 Achilleol A 與 Camelliol C。這兩個單環產物皆是由單環 C-6 碳陽離子中間物所衍生而來的，它們的差別是在不同的位置行脫氫反應而形成雙鍵終止反應。由於 Trp390 位置的定點飽和突變株所產生的產物除了野生型 ERG7 會產生的羊毛硬脂醇外，只有單環的產物，所以我們可以初步推測 Trp390 位置在酵母菌 ERG7 中所具有的功能可能與開環或 A 環的形成有關。

Substitutions for Trp390	Products percentages (%)			
	Ilanosterol	Achilleol A	Camelliol C	
Aliphatic Group	Gly(G)	No product		
	Ala(A)	100		
	Val(V)	100		
	Leu(L)	100		
	Ile(I)		100	
Acidic and amide group	Asp(D)	100		
	Asn(N)	62.7	22.5	14.8
	Glu(E)	25.5	41.7	32.8
	Gln(Q)	100		
Basic group	His(H)	No product		
	Lys(K)	No product		
	Arg(R)	No product		
Hydroxyl- Group	Ser(S)	100		
	Thr(T)	66.9	21.1	12.0
Sulfur- containing	Cys(C)	13.3	59.0	12.7
	Met(M)		100	
Aromatic Group	Phe(F)	92.6	7.4	0
	Tyr(Y)	28.3	59.0	12.7
Imino	Pro(P)	0	67.0	33.0

《表 3-2》酵母菌 ERG7^{W390X} 的產物分析表

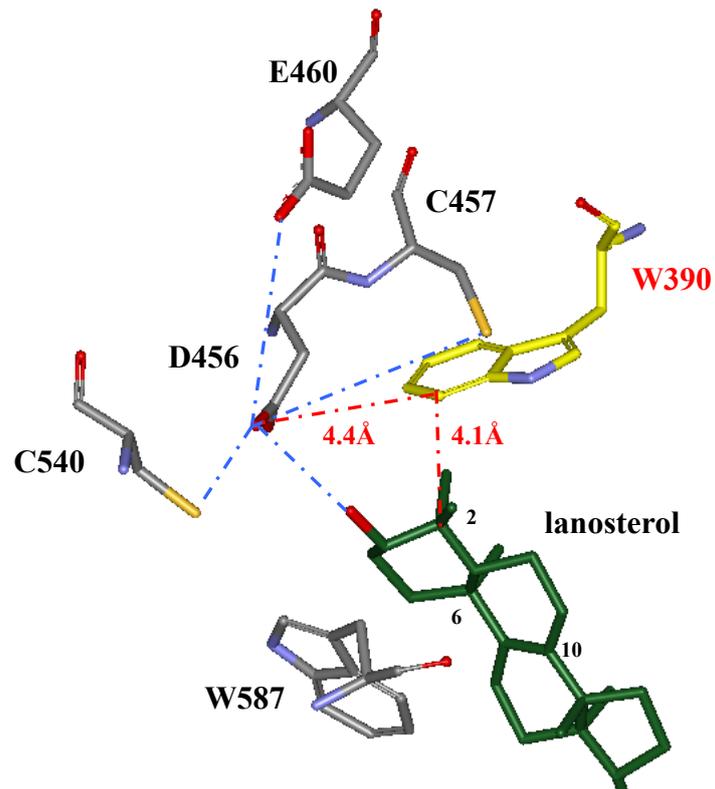


《圖 3-2》酵母菌 $ERG7^{W390X}$ 其產物質譜與其結構對照圖

3.1.4 ERG7^{W390X} 突變株電腦模擬分析

由於目前酵母菌 ERG7 尚未有結晶結構被解析出來，所以我們在進行 ERG7 的結構分析時，必須先利用相似度較高的人類 OSC 結晶結構作為模版，來模擬酵母菌中其 ERG7 活性區域胺基酸的相對空間位置。因此，我們首先從蛋白質結構資料庫 (PDB bank) 取得人類 OSC 的 PDB 檔案並與酵母菌 ERG7 的胺基酸序列進行排序，接著利用國家高速網路中心的化學軟體資料庫與其應用程式中的 Insight II 軟體進行結構的模擬建構，之後再利用 SYBYL 軟體在模擬結構中放入受質以進行能量最小化計算，並模擬出當受質存在時酵素的最佳構形。

《圖 3-3》顯示當羊毛硬脂醇為受質時 Trp390 位置與幾個開環相關的胺基酸相對位置。其中 Asp456 已由實驗證實為酵母菌 ERG7 進行開環時提供質子的胺基酸；而 Cys540 與 Cys457 則是被認為會與 Asp456 形成氫鍵以增加其酸性；Glu460 則是具有重新質子化 Asp456 的功能⁴³。由於在先前細菌 SHC 與人類 OSC 的研究中，曾經指出相對酵母菌 ERG7 中 Trp390 位置的胺基酸也具有影響開環以及與 A 環形成有關的功能，並且可能具有辨認受質的能力有關⁴⁵，所以接下來我們會以這幾點作為討論的重點。



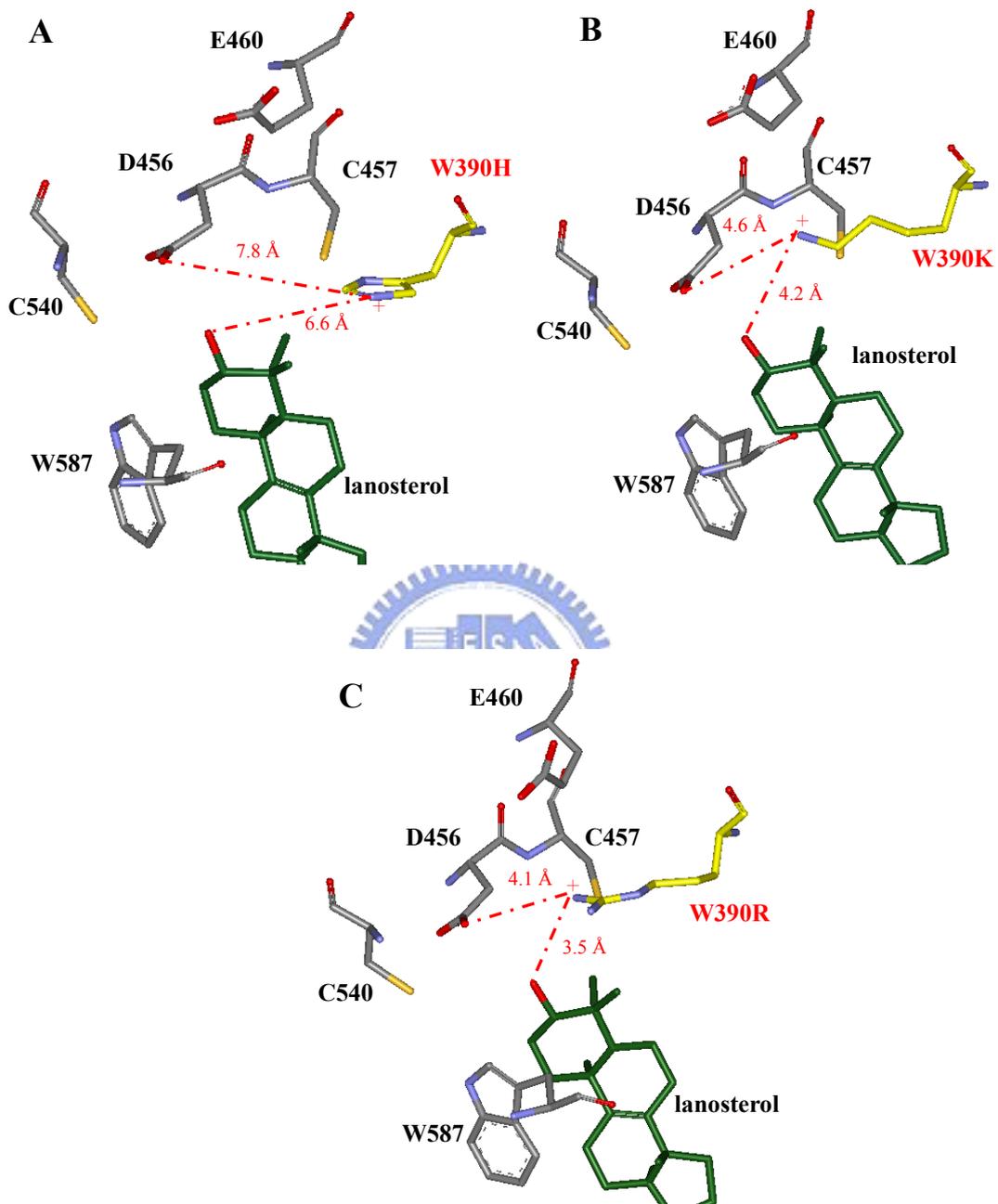
《圖 3-3》野生型酵母菌 ERG7^{W390} 與附近胺基酸結構模擬圖

3.1.4.1 帶正電基酸對開環的影響

從麥角固醇補充與反向篩選的分析可以發現，三個帶正電的鹼性胺基酸 His、Lys 與 Arg 都會造成酵母菌 ERG7 的失活，導致菌株死亡。而經過外加麥角固醇來進行酵素產物分析後，也發現這三個胺基酸完全沒有得到任何產物。沒有得到產物的原因可能是因為 Trp390 在酵素中擔任了辨認受質的角色，當突變成其他不適用的胺基酸時，會造成受質無法連結導致酵素的失活；另一個原因則是因為突變過後的胺基酸可能會影響開環的步驟，使得整個環化步驟終止才會都沒有產物的生成。《圖 3-4》顯示經突變過後其 His 390、Lys390 和 Arg390 與提供質子開環的 Asp456 之距離，分別為 7.8 Å、4.6 Å 與 4.1 Å；而在野生型中，Trp390 與 Asp456 距離則為 4.4 Å。從距離上來看，經突變過後除了 His 外，在距離上的改變並不顯著，所以距離應該不是影響酵素失去活性的主要因素。

而這些帶正電荷胺基酸都具有一個共同的特色，就是在其側鏈上帶有正電《圖 3-4》。我們推測這些正電可能會因為電性關係而排斥 Asp456 上所用來提供開環的質子，而其正電對質子的排斥力相對於不帶電性的環氧基對其的吸引力大上許多，所以會排斥質子使得開環反應終止。另一方面 His 390、Lys390 和 Arg390 與已質子化的環氧基的距離為 6.6 Å、4.2 Å 與 3.5 Å 《圖 3-4》，我們認為這些鹼性胺基酸也會在開環之後從開環質子化的環氧基上排斥其質子而終止反應，使得酵素失去活性。

綜合以上兩點我們可以下一個結論，在 Trp390 位置所突變的鹼性胺基酸可能可以藉由其側鏈上所攜帶的正電來推擠開環時所需要的質子，或是在開環之後直接排斥轉移到環氧基上的質子進而終止反應使酵素無法進行下一步的反應。



《圖 3-4》A. 酵母菌 ERG7^{W390H} 結構模擬圖。B. 酵母菌 ERG7^{W390K} 結構模擬圖。C. 酵母菌 ERG7^{W390R} 結構模擬圖。

3.1.4.2 Trp390 與 A 環形成的關係

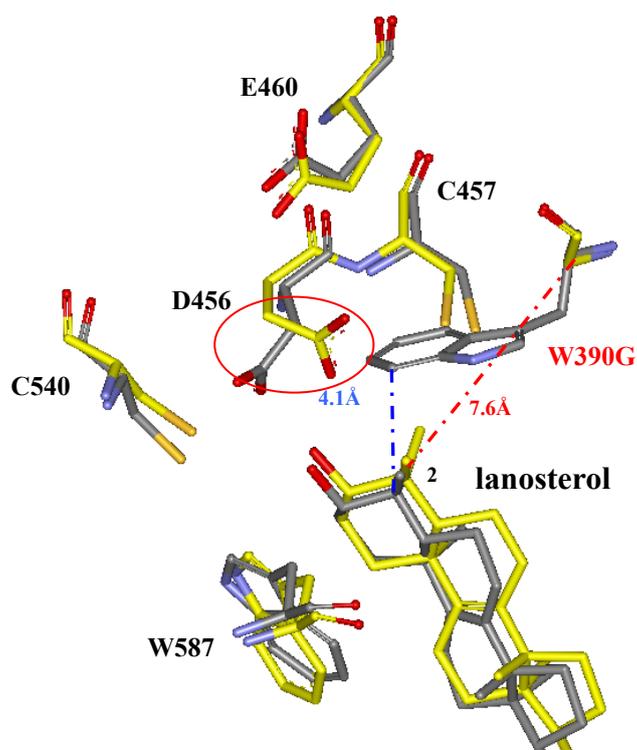
在 2004 年所發表的人類 OSC 結晶結構的論文中，曾經指出人類 OSC 的 Trp387 其立體空間位置可能可以透過碳陽離子與 π 電子的共振作用對於 A 環或 B 環也就是 C-2、C-6 與 C-10 號上的碳陽離子具有穩定的作用。經過我們利用人類 OSC 的結構為模版，模擬出的酵母菌 ERG7 的結構後，我們發現 Trp390 剛好在在 C-2 號位置的上方並與 A 環較為靠近，且其距離約為 4.1 Å 《圖 3-3》，所以我們推測 Trp390 可能對於穩定 A 環形成具有較大的功能。

而在功能性篩選中會使酵素失去活性的幾個胺基酸取代中，Trp390Gly 的突變株也是沒有得到任何的產物的突變點。我們繼而利用電腦模擬建構了 ERG7^{W390G} 的蛋白質結構圖，並且與野生型的 ERG7 進行重疊觀察以了解其結構的變化。在《圖 3-5》中，黃色部分為經由 Trp390Gly 突變過後的結構而灰色的則為野生型酵母菌的 ERG7，由比較圖中我們可以發現 Asp456 的角度有超過九十度的旋轉，並且指向另外一側，經過我們比較其相對距離發現，雖然除了 Asp456 會與 Cys457 距離縮短且與 Cys540 的距離變遠之外，並沒有太大改變《表 3-3》，但 Asp456 的角度可能會是影響開環功能的因素。

Wild type ERG7	D456----> O	3.2Å
Wild type ERG7	D456----> C457	6.9Å
Wild type ERG7	D456----> C540	3.1Å
Wild type ERG7	D456----> E460	6.1Å
ERG7 ^{W390G}	D456----> O	3.3Å
ERG7 ^{W390G}	D456----> C457	3.4Å
ERG7 ^{W390G}	D456----> C540	4.1Å
ERG7 ^{W390G}	D456----> E460	6.1Å

《表 3-3》 ERG7^{W390G} 與野生型 ERG7 胺基酸相對距離比較

在《圖 3-5》中，另外一個較大的改變則是突變位置與 C-2 的距離變化，在野生型 ERG7 中 Trp390 與 C-2 的距離為 4.1 Å，當突變成 Gly 以後距離增加到 7.6 Å。比較 Gly 與其他的胺基酸，Gly 不具有任何側鏈且無法提供任何的立體空間障礙使得結構應較為鬆散，再加上突變過後 Gly 與 C-2 的距離變得相當的遠，所以無法提供對於形成 A 環時的 C-2 碳陽離子的穩定作用而使得反應在開環以後隨即終止，才會使得 ERG7^{W390G} 也沒有任何產物的生成。

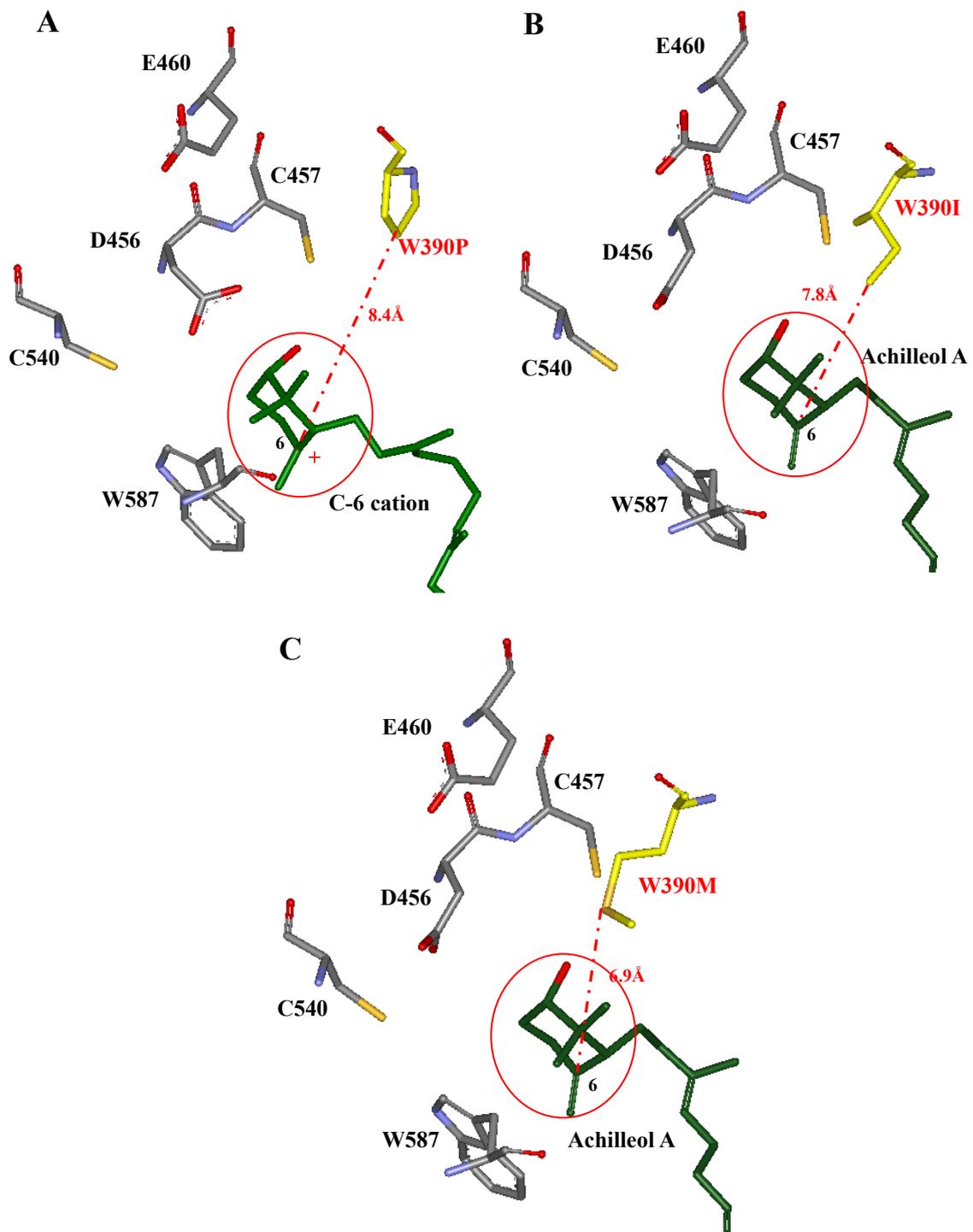


《圖 3-5》ERG7^{W390G} (黃色) 與野生型的 ERG7 (灰色) 空間結構比較

除了上述所討論的四個胺基酸以外，在其餘的胺基酸取代中，除了羊毛硬脂醇以外，很多胺基酸的突變株中都附帶產生了單環的 Achilleol A 與 Camelliel C，其中在 Ile、Met 與 Pro 三個致死突變點中則沒有羊毛硬脂醇生成。在這三個會使酵素失去活性的胺基酸突變點中，ERG7^{W390P} 的產物有 Achilleol A 與 Camelliel C，而 ERG7^{W390M} 與 ERG7^{W390I} 則只有 Achilleol A。

下面《圖 3-6》中顯示了這三個胺基酸突變點與其受質的空間相對位置，其中 ERG7^{W390P} 因為同時有 Achilleol A 與 Camelliel 的生成，所以我們選用 C-6 碳陽離子中間物為其受質進行了電腦模擬，而 ERG7^{W390M} 與 ERG7^{W390I} 突變株則以 Achilleol A 作為受質。從下圖中我們可以發現突變過後的受質 C-6 碳陽離子與突變胺基酸 Pro390、Ile390 和 Met390 的距離加長分別為 8.4Å、7.8Å 與 6.9Å。這些擴大的距離可能會使得 C-6 碳陽離子中間物無法被穩定下來而促使其在 A 環形成以後直接進行脫氫終止反應，才會得到全部皆為單環的產物。

雖然在其餘的胺基酸突變株中，產物大部分是以羊毛硬脂醇為主，但仍有許多會連帶生成單環產物 Achilleol A 與 Camelliel C 的突變株，可見 Trp390 在酵母菌 ERG7 中對於 A 環的確具有重要的影響。在這些其餘的胺基酸取代中，會產生單環產物的原因我們推測可能與上述 Pro、Ile 和 Met 的突變株類似，不過因為在這些胺基酸中可能可以部分或者是全部互補野生型 ERG7^{W390} 的功能，所以才會產生部分羊毛硬脂醇的產物。



《圖 3-6》A. 酵母菌 ERG7^{W390P} 結構模擬圖。B. 酵母菌 ERG7^{W390I} 結構模擬圖。C. 酵母菌 ERG7^{W390M} 結構模擬圖。

3.2 酵母菌 $ERG7^{W587X}$ 功能性分析

3.2.1 建構 $ERG7^{W587}$ 飽和定點突變株

為了建構酵母菌 $ERG7^{W587}$ 的飽和定點突變株，我們依照第 3.1.1 章節相同的方法，成功地利用 QuikChange site-directed mutagenesis kit 建構另一胺基酸 $ERG7^{W587X}$ 的定點飽和突變株質體 DNA。

3.2.2 $ERG7^{W587X}$ 突變株功能性補充篩選

建構完飽和突變質體後，我們利用電穿孔的方式將質體轉植到宿主細胞中，並依照第 3.1.2 章節所陳述相同的方式進行功能性篩選，藉由這兩個功能性的篩選我們可以初步辨別經由突變後 Trp587 位置對酵素環化機制是否具有重要的影響《表 3-4》。由功能性篩選的結果中可以發現除了芳香族性的胺基酸 Tyr 與 Phe 外，所有的胺基酸取代都會導致酵素的失活，所以我們認為 Trp587 其側鏈上的芳香環在環化過程中一定扮演著十分重要的角色，這個結果令我們對於 Trp587 的功能更加感興趣。

Substitutions for Trp587		Enzyme mapping	Ergosterol supplement	Counter-selection
Aliphatic group	Gly(G)	✓	—	—
	Ala(A)	✓	—	—
	Val(V)	✓	—	—
	Leu(L)	✓	—	—
	Ile(I)	✓	—	—
Acidic and amide group	Asp(D)	✓	—	—
	Asn(N)	✓	—	—
	Glu(E)	✓	—	—
	Gln(Q)	✓	—	—
Basic group	His(H)	✓	—	—
	Lys(K)	✓	—	—
	Arg(R)	✓	—	—
Hydroxyl-group	Ser(S)	✓	—	—
	Thr(T)	✓	—	—
Sulfur-containing	Cys(C)	✓	—	—
	Met(M)	✓	—	—
Aromatic group	Phe(F)	✓	+	+
	Tyr(Y)	✓	+	+
Imino	Pro(P)	✓	—	—

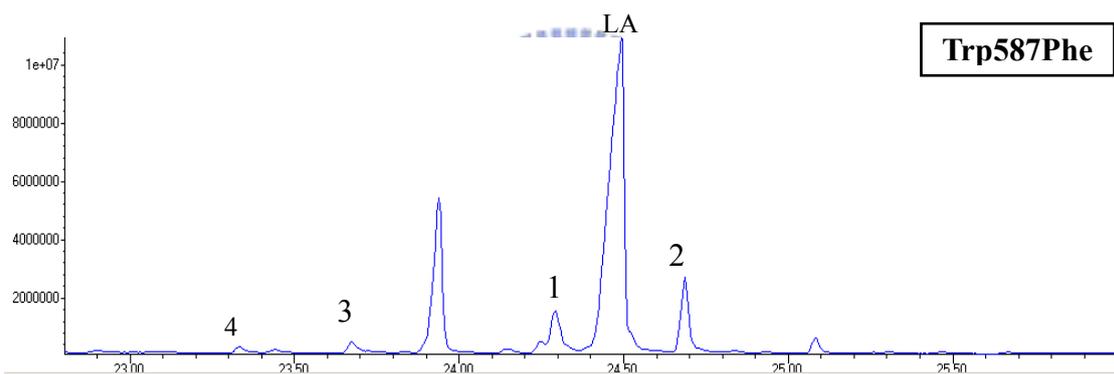
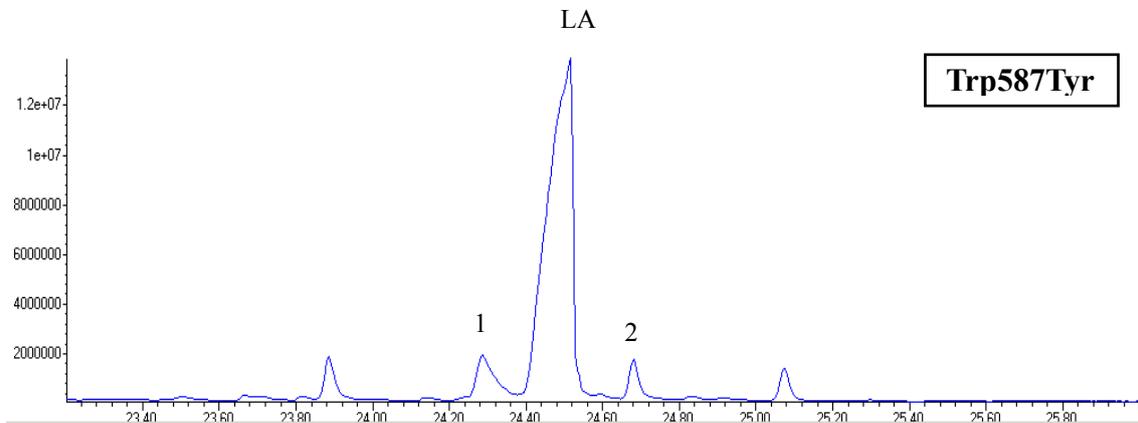
《表 3-4》酵母菌 ERG7^{W587X} 功能性篩選表

3.2.3 ERG7^{W587X} 突變株產物分析

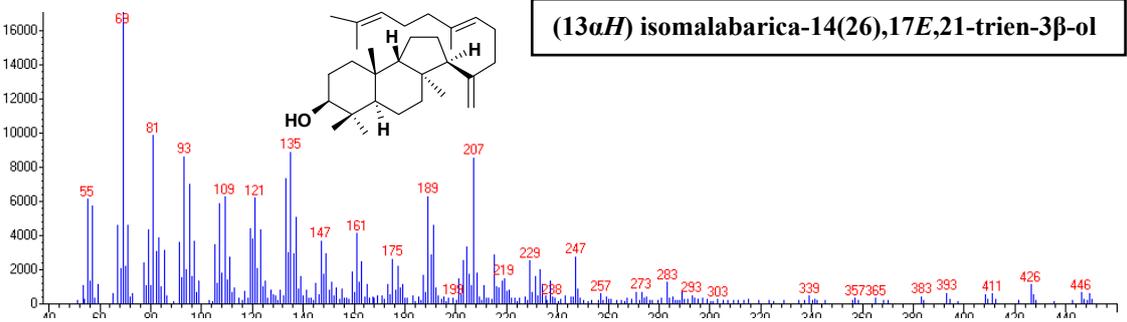
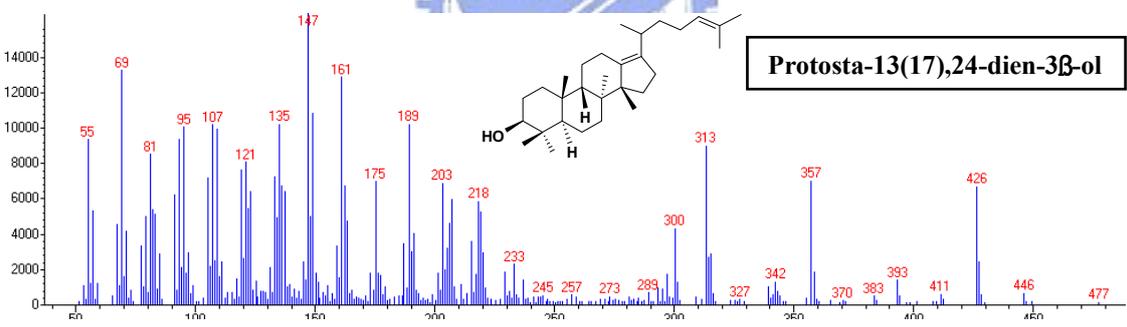
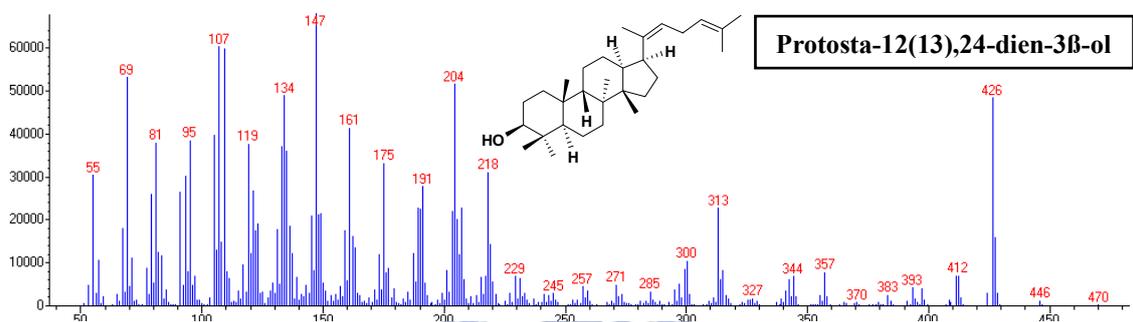
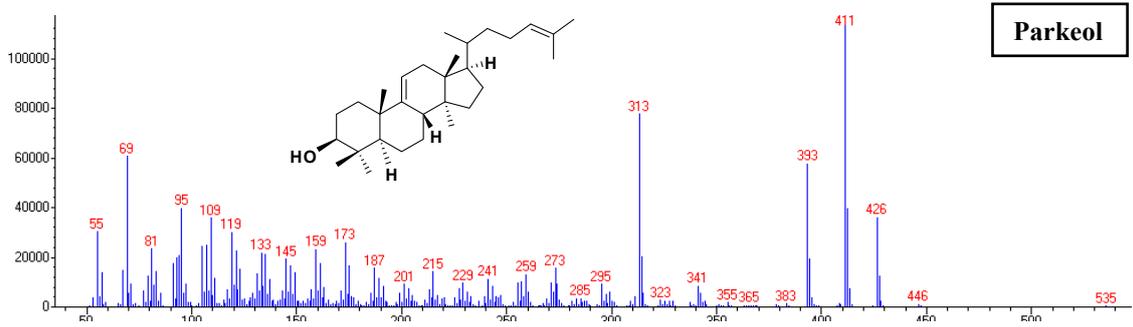
經過功能性篩選後，我們利用與第 3.1.3 章節相同的方法來進行 ERG7^{W587X} 突變株的產物分析，並由 GC-MS 來鑒定產物《圖 3-7》《圖 3-8》與分析產物的比例《表 3-5》。從《表 3-5》中我們可以發現所有會使酵素失去活性的突變點都沒有得到任何的產物，而在 ERG7^{W587Y} 與 ERG7^{W587F} 的突變株中產物則是以羊毛硬脂醇為主，另外在 ERG7^{W587Y} 的突變株中還產生了少量的四環產物如 parkeol 與 protosta-12(13),24-dien-3 β -ol；而 ERG7^{W587F} 的突變株則額外生成了四環的 protosta-13(17),24-dien-3 β -ol 與三環的 (13 α H) isomalabarica-14(26),17E,21-trien-3 β -ol。

Substitutions for Trp390		Products percentages (%)				
		1	2	3	4	5
Aliphatic Group	Gly(G)			No product		
	Ala(A)			No product		
	Val(V)			No product		
	Leu(L)			No product		
	Ile(I)			No product		
Acidic and amide group	Asp(D)			No product		
	Asn(N)			No product		
	Glu(E)			No product		
	Gln(Q)			No product		
Basic group	His(H)			No product		
	Lys(K)			No product		
	Arg(R)			No product		
Hydroxyl-Group	Ser(S)			No product		
	Thr(T)			No product		
Sulfur-containing	Cys(C)			No product		
	Met(M)			No product		
Aromatic Group	Tyr(Y)	89.7	4.1	6.2	0	0
	Phe(F)	78.8	10.5	7.6	2.3	0.8
Imino	Pro(P)			No product		

《表 3-5》酵母菌 ERG7^{W587X} 產物分析表，其中 1 為羊毛硬脂醇 (lanosterol)；2 為 protosta-12(13),24-dien-3 β -ol；3 為 protosta-13(17),24-dien-3 β -ol；4 則為 (13 α H) isomalabarica-14(26),17E,21-trien-3 β -ol



《圖 3-7》酵母菌 $ERG7^{W587Y}$ 與 $ERG7^{W587F}$ 突變株產物相對應時間圖，其中 LA 為羊毛硬脂醇；1 為 protosta-12(13),24-dien-3 β -ol；2 為 parkeol；3 為 protosta-13(17),24-dien-3 β -ol；4 為 (13 α H) isomalabarica-14(26),17E,21-trien-3 β -ol

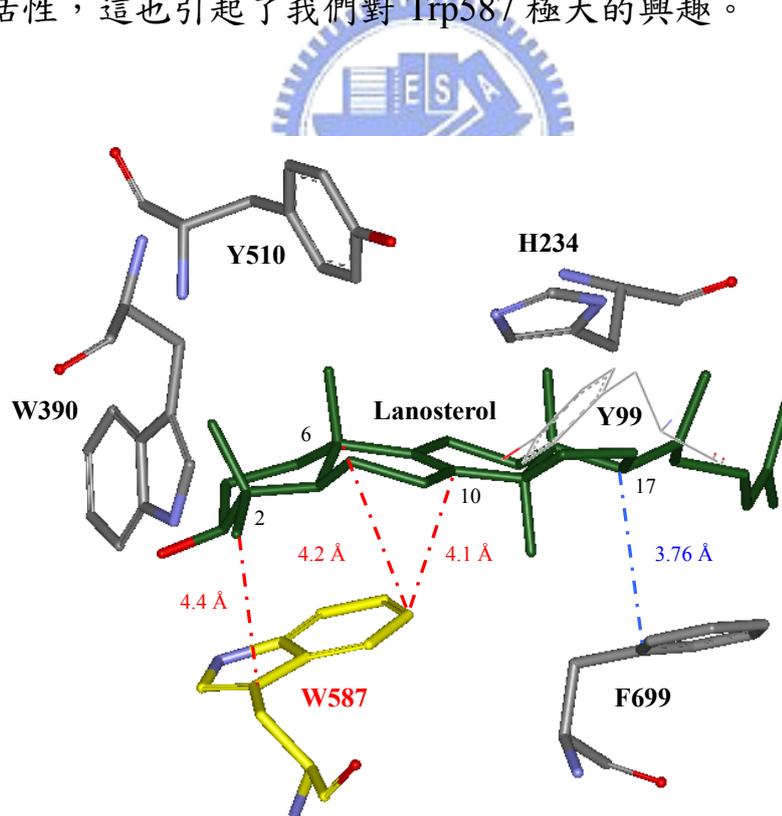


《圖 3-8》酵母菌 $ERG7^{W587Y}$ 與 $ERG7^{W587F}$ 突變株產物質譜與結構對照圖

3.2.4 ERG7^{W587X} 突變株電腦模擬分析

在 ERG7^{W587X} 突變株的電腦模擬分析方面，我們使用與第 3.1.4 章節相同的方式，並利用國家高速網路中心的化學軟體資料庫與其應用程式來進行野生型 ERG7 與突變株的電腦模擬。

下圖顯示了在野生型的 ERG7 中，當我們以羊毛硬脂純為受質時，Trp587 與其附近一些重要胺基酸的空間相對應位置《圖 3-9》。在人類 OSC 中，相對應 ERG7 中 Trp587 位置的 Trp581 被認為會藉由碳陽離子與 π 電子共振作用來穩定 A 環與 B 環在形成過程中所產生的 C-6 和 C-10 的碳陽離子中間物；但由產物的分析結果中發現我們在酵母菌 ERG7^{W587X} 的突變株中得到了三環與四環的產物，更令人感到有趣的是除了芳香族胺基酸以外，其它的突變點都會使得酵素完全失去活性，這也引起了我們對 Trp587 極大的興趣。



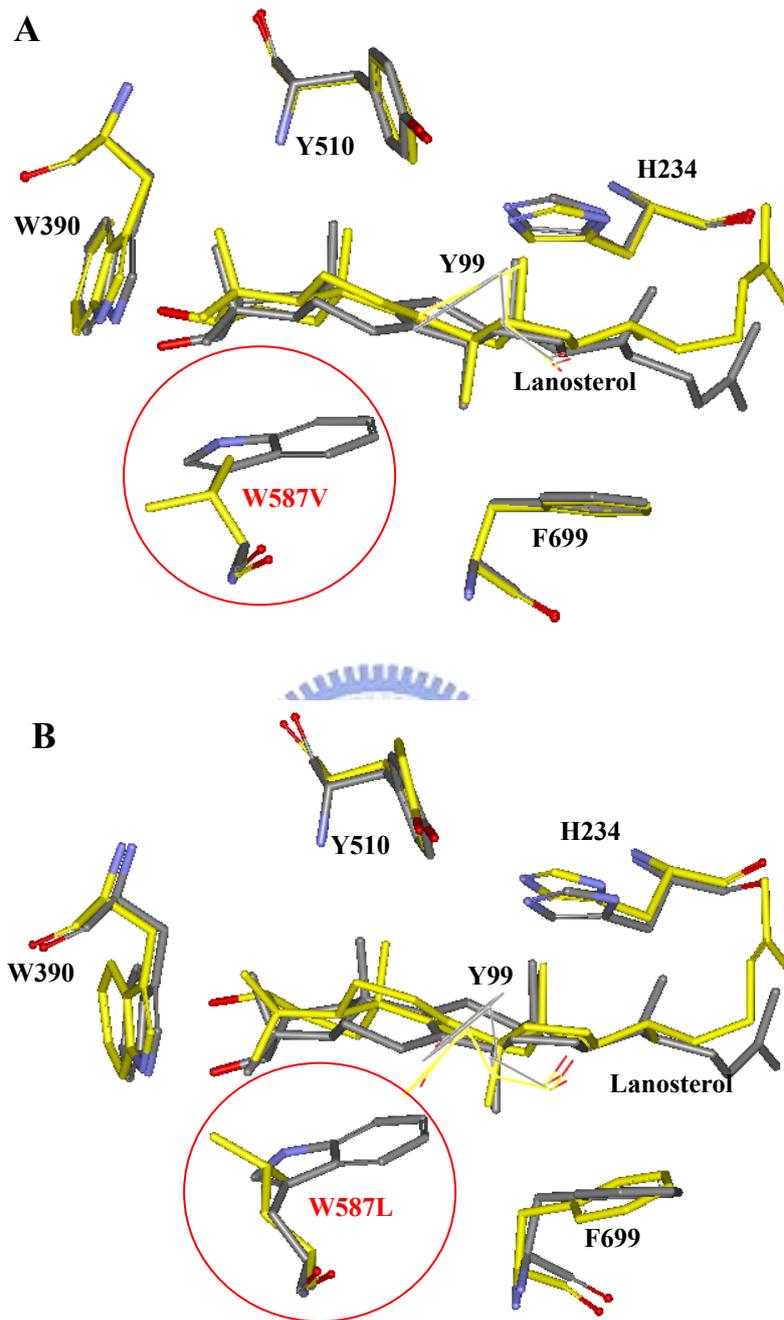
《圖 3-9》野生型酵母菌 ERG7^{Trp587} 與附近胺基酸結構模擬圖

3.2.4.1 Trp587 與受質間的關係

在先前細菌 SHC 的酵素動力學的研究中，曾經指出 Trp489（其對應到酵母菌 ERG7 為 Trp587）在環化酵素中可能扮演著辨認受質的功用，因為若將其突變成 Val 與 Leu 都會使酵素完全失去活性⁷³。而在酵母菌 ERG7^{W587X} 突變株中，我們所得到的結果是除了芳香族性胺基酸 ERG7^{W587Y} 與 ERG7^{W587F} 外，所有的突變株都會導致酵素失去活性。

芳香族胺基酸的最大特點是在於其側鏈上所具有的芳香環，這些芳香環在其環的上下方富含 π 電子雲，許多研究都曾指出這些芳香族胺基酸會利用其 π 電子與受質的碳陽離子產生碳陽離子與 π 電子的共振作用來穩定受質的環化過程，這也使得芳香族胺基酸在酵素內顯得格外重要。另外，還有研究指出芳香族胺基酸可以利用其 π 電子與受質的甲基形成 CH- π 的交互作用或是與受質的 π 軌域互相堆疊形成辨認受質的力量。這個特點在酵母菌 ERG7 的胺基酸 Trp587 中可以十分明顯的被觀察到。因此我們將以不含有 π 電子的 ERG7^{W587V} 和 ERG7^{W587L} 突變株與野生型 ERG7 的電腦模擬圖為例，加以比較並進行說明。

從《圖 3-10A》中，我們可以發現在突變過後 Trp587 附近的胺基酸空間位置幾乎沒有改變，但因為 Val 並不具有芳香族的 π 電子雲來與受質交互作用，使得酵素無法辨認受質而失去活性；而在《圖 3-10B》中，雖然 Leu587 附近的胺基酸結構產生些許的改變，但 Leu 仍然因為不具有辨認受質的能力而會使酵素失去活性。同樣地，在其他十五個非芳香族的胺基酸中我們都可以觀察到類似的現象，所以我們可以推測 Trp587 在酵母菌 ERG7 中具有辨認受質的重要功能。



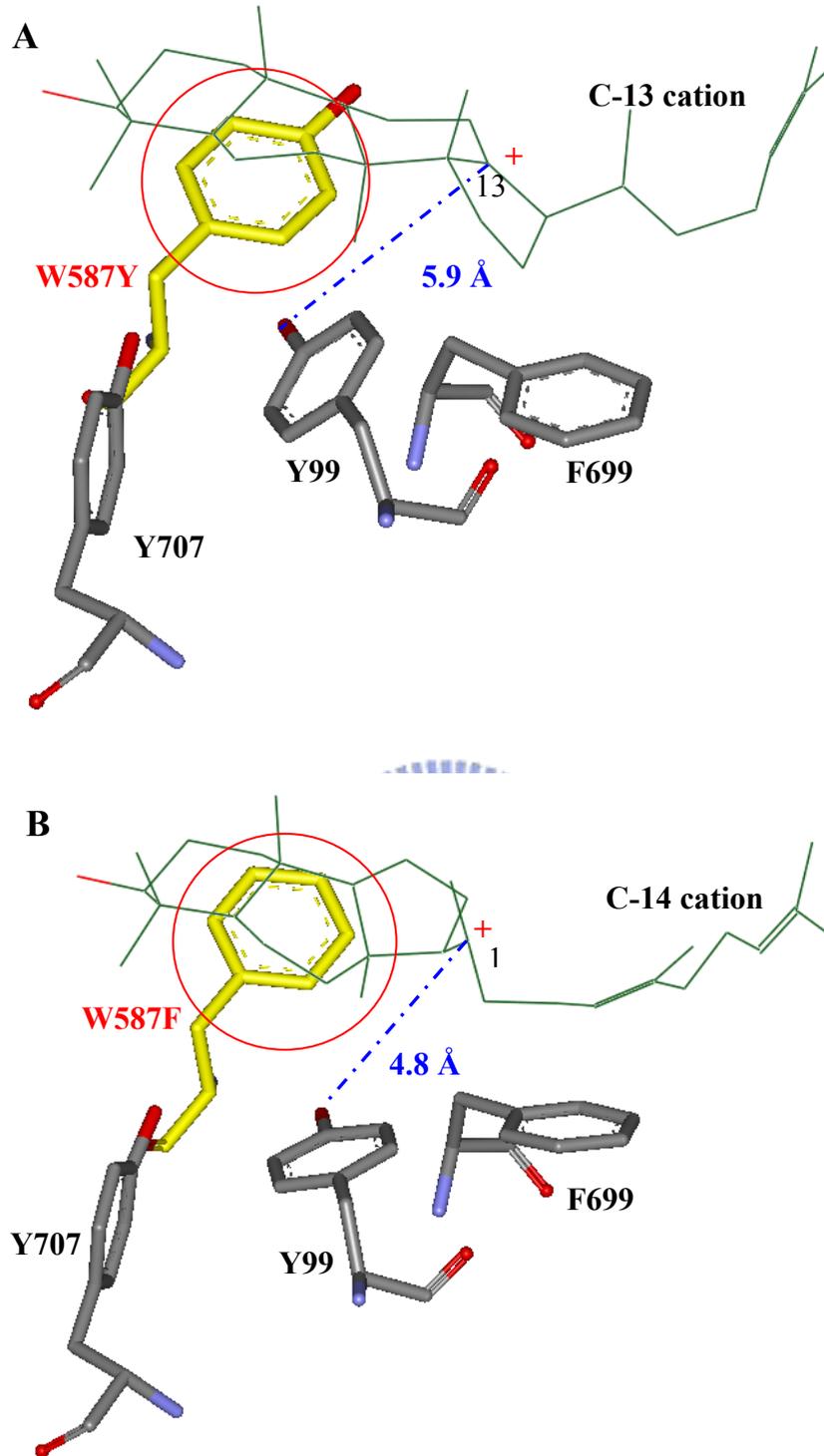
《圖 3-10》A. ERG7^{W587V} 突變株（黃色）與野生型 ERG7（灰色）其空間結構的比較 B. ERG7^{W587L} 突變株（黃色）與野生型 ERG7（灰色）其空間結構的比較

3.2.4.2 Trp587 在環化過程所扮演的角色

從《圖 3-9》野生型酵母菌 ERG7 的結構模擬圖中，我們可以發現 Trp587 位於 A 環與 B 環的下方，這也就是其在人類 OSC 中被認為會藉由碳陽離子- π 電子的共振作用來穩定 A 環與 B 環形成的理由，不過在細菌 SHC 中曾經有較不一樣的實驗結果被提出。從細菌 SHC 的結晶結構中我們可以發現其 Trp489（對應到酵母菌 ERG7 為 Trp587）的空間位置也是位於 A 環與 B 環的下方，但是在 Trp489 的定點突變實驗中卻會使產物除了得到五圓環的蛇麻烯和蛇麻醇之外，還會生成 6-6-6-5 圓環的四環新產物。這個實驗結果顯示 Trp587 可能不是直接影響 A 環與 B 環的形成，而是透過與其他附近胺基酸的交互作用來影響接下來的環化反應。

從我們的產物分析結果中《表 3-5》，我們可以發現在 ERG7^{W587Y} 的突變株中我們得到了一個四環的產物 protosta-12(13),24-dien-3 β -ol，而在 ERG7^{W587F} 的突變株中還額外多得到了四環的 protosta-13(17),24-dien-3 β -ol 與 6-6-5 圓環的三環產物 (13 α H) isomalabarica-14(26),17E,21-trien-3 β -ol。這個結果除了再度證明酵母菌 ERG7 需要 Trp587 提供芳香環來辨認受質外，也說明了 Trp587 可能會間接地影響 C-14 與 C-17 的碳陽離子附近的胺基酸，才會得到三環與在不同位置行脫氫反應的四環產物。

在下圖《圖 3-11》的兩張結構模擬圖中，《圖 3-11A》是 ERG7^{Trp587Tyr} 突變株的結構模擬圖，因為在 ERG7^{Trp587Tyr} 的突變株中，我們得到了 protosta-12(13),24-dien-3 β -ol，所以我們選用 C-13 的碳陽離子作為受質進行入塢（docking）電腦模擬；《圖 3-11B》則是 ERG7^{W587F} 突變株的結構模擬圖，因為其得到了三環的 (13 α H) isomalabarica-14(26),17E,21-trien-3 β -ol，所以我們選用 C-14 的碳陽離子中間物為受質進行入塢電腦模擬。從圖 A 中，我們可以發現將 Trp 突變成 Tyr 後，其 Tyr587 不會像其他在野生型 ERG7 中的 Tyr（如 Tyr99



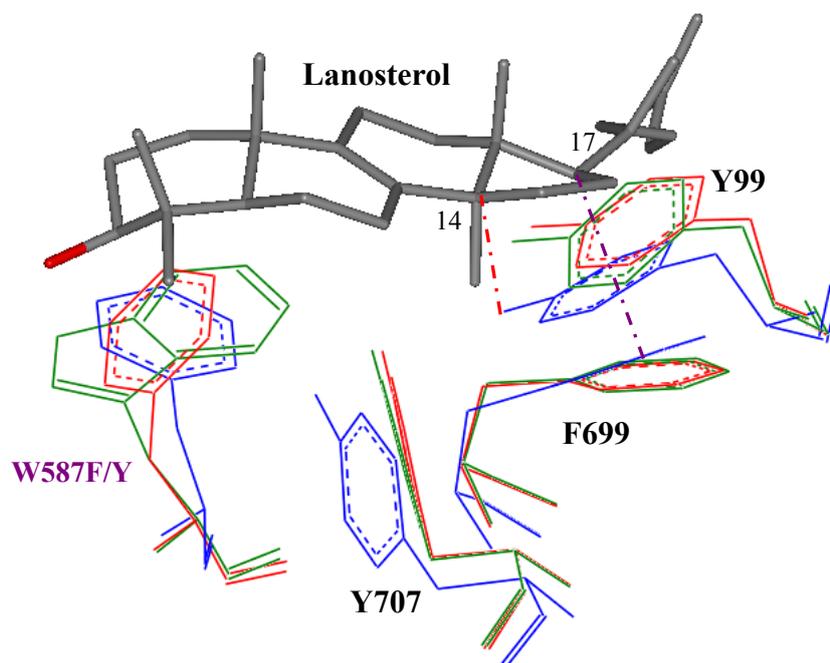
《圖 3-11》A. 在 ERG7^{W587Y} 突變株中，我們以 C-13 的碳陽離子中間物為受質進行入塢（docking）的結構模擬圖 B. 在 ERG7^{W587F} 突變株中，我們以 C-14 的碳陽離子中間物為受質進行入塢的結構模擬圖

與 Tyr707 等)，總是指向以受質提供一個立體空間障礙，反而是以它的芳香環來面對受質，這個特性使得 Tyr 也可以提供它的苯環來辨認受質，並且可以利用它的 π 電子雲來穩定 C-6 與 C-10 的碳陽離子，因此可以部分互補了原本 Trp587 的功能，所以整個環化反應才沒有在 A 環或是 B 環形成之後就被迫終止。而在整個環化反應結束後，酵素開始進行去質子化的脫氫作用，不過由於突變過後的 Tyr587 影響到整體的空間結構，使得 Tyr99 對於 C-13 的距離由在野生型酵母菌 ERG7 中的 5.2 Å 加長到 5.9 Å，這個改變使得 C-13 的碳陽離子較不穩定，而在此步驟變形脫氫反應而形成雙鍵才會產生 protosta-12(13),24-dien-3 β -ol。

在《圖 3-11B》的 ERG7^{W587F} 突變株結構模擬圖中，同樣地我們可以發現 Phe 可以提供其苯環來辨認受質與穩定 A 環與 B 環的形成，因此可以部分互補 Trp587 的功能。與 ERG7^{W587Y} 突變株結果不同的地方，在於它產生了在 C-14 號碳陽離子終止的 6-6-5 圓環的三環產物(13 α H) isomalabarica-14(26),17E,21-trien-3 β -ol。我們推測這是由於在突變成 Phe 之後改變了 Tyr99 對於 C-14 碳陽離子的距離，從原本的 3.8Å 增加為 4.8Å 因而使 C-14 碳陽離子不夠穩定，因而造成部分受質在此便行終止反應而形成三環的產物。另一部分的受質在完成環化反應以後，則依照與 ERG7^{W587Y} 突變株中相似的機制而同樣形成四環的 protosta-12(13),24-dien-3 β -ol。另外，還有一部分受質則因為 Phe699 的角度與距離的改變，因而影響 C-17 碳陽離子的穩定而生成 protosta-13(17),24-dien-3 β -ol 《圖 3-12》。

在《圖 3-12》中，我們將野生型的酵母菌 ERG7 (綠色) 與 ERG7^{W587Y} (紅色) 與 ERG7^{W587F} (藍色) 突變株的結構進行重疊，來觀察其空間相對應位置的變化，並且標示出重要胺基酸與受質羊毛硬脂醇間的距離《表 3-6》。從圖中我們可以發現在 ERG7^{W587Y} 的突變株中其 Tyr99 相較於在其它兩個突變環化酵素的位移較大而距受質也較遠，所以無法穩定 C-13 與 C-14 碳陽離子的位置，所以才會生成三

環產物；同樣地， $ERG7^{W587F}$ 的 Phe699 與其在另外兩個突變環化酵素中，其角度相差較大進而影響在 C-17 位置的脫氫反應因而形成產物。



《圖 3-12》 $ERG7^{W587Y}$ (紅色) $ERG7^{W587F}$ (藍色) 與野生型 $ERG7$ (綠色) 的空間結構比較圖

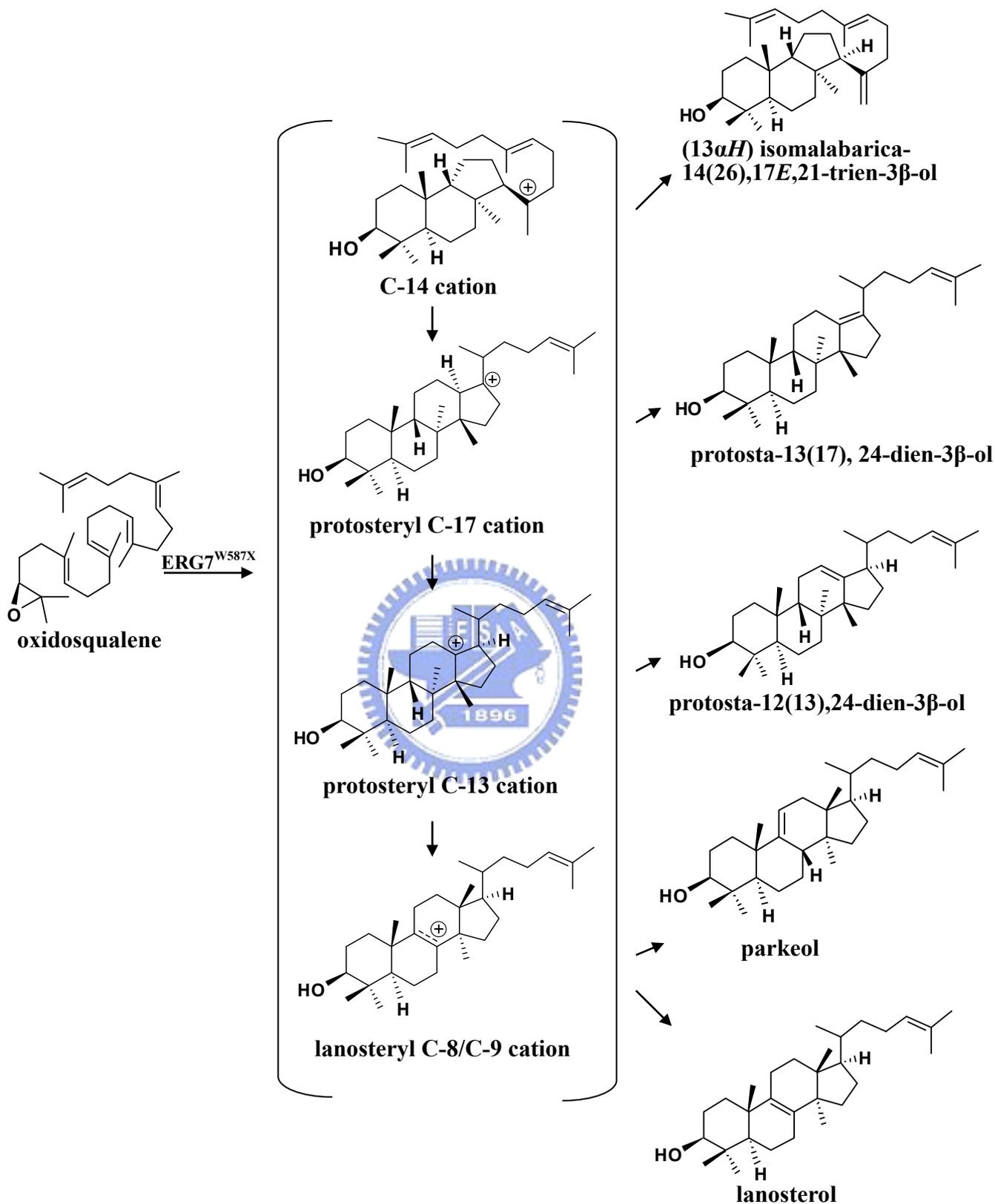
$ERG7^{W587}$	Y99----> C-13	5.2 Å
$ERG7^{W587}$	Y99----> C-14	3.9 Å
$ERG7^{W587}$	F699----> C-17	3.8 Å
$ERG7^{W587Y}$	Y99----> C-13	4.9 Å
$ERG7^{W587Y}$	Y99----> C-14	3.6 Å
$ERG7^{W587Y}$	F699----> C-17	3.8 Å
$ERG7^{W587F}$	Y99----> C-13	5.6 Å
$ERG7^{W587F}$	Y99----> C-14	4.2 Å
$ERG7^{W587F}$	F699----> C-17	3.4 Å

《表 3-6》 $ERG7^{W587Y}$ 、 $ERG7^{W587F}$ 和野生型 $ERG7$ 胺基酸與受質相對應的距離比較表

3.2.5 ERG7^{W587X} 產物生成途徑推測

《圖 3-13》為酵母菌 ERG7^{W587X} 其定點飽和突變的產物生成途徑推測圖。在所有突變點中只有 ERG7^{W587F} 與 ERG7^{W587Y} 不會使酵素失去活性而有產物的生成。在這兩個突變株中，受質氧化鯊烯會依照椅型-船型-椅型 (chair-boat-chair) 的結構排列，當環化反應進行到欲行 C 環擴環之前的依反馬可尼可夫法則形成的 6-6-5 碳-14 碳陽離子中間物時，有一部分受質會在此行終止反應而形成 (13 α H) isomalabarica-14(26),17E,21-trien-3 β -ol。

接著 C 環會進行擴環而形成六圓環，等到 D 環形成以後，環化反應便告一段落而形成 prosteryl C-20 的碳陽離子中間物。再來便開始行骨架重排的反應，C-17 上的氫基會轉移到 C-20 而形成 prosteryl C-17 的碳陽離子中間物，由於突變株影響了附近胺基酸 Phe699 而使得部分受質在此終止反應而形成 protosta-13(17),24-dien-3 β -ol。然後 C-13 的氫基再轉移到 C-17 而形成 prosteryl C-13 碳陽離子中間物，又因為突變後影響 Tyr99 的距離與角度使得一部分受質在此形成 protosta-12(13),24-dien-3 β -ol。最後，經過一連串的氫基與甲基轉移形成最終的 lanosteryl C-8/C-9 cation，由於在不同的位置行脫氫反應進而生成 parkeol 與 lanosterol。



《圖 3-13》ERG7^{W587X} 產物假設生成路徑推測圖

3.3 酵母菌 $ERG7^{F528X}$ 功能性分析

3.3.1 建構 $ERG7^{F528}$ 飽和定點突變株

建構酵母菌 $ERG7^{F528}$ 的定點飽和突變株，我們是比照與第 3.1.1 章節相同的方法，利用 QuikChange site-directed mutagenesis kit 建構胺基酸 $ERG7^{F528X}$ 的定點飽和突變株質體 DNA。

3.3.2 $ERG7^{F528X}$ 突變株功能性補充篩選

建構完飽和突變質體後，我們利用電穿孔的方式並依照第 3.1.2 章節所述相同的條件以進行功能性篩選，我們藉由這兩個功能性篩選可以初步辨別經突變後的 Phe 取代胺基酸對酵素環化機制上是否具有重要的影響《表 3-7》。從下表中可以發現除了 Asp、Arg 與 Thr 以外，大部分的胺基酸突變株都可以互補或是部分互補原本 Phe528 的功能，並不會使酵素失去活性。



Substitutions for Phe528		Enzyme mapping	Ergosterol supplement	Counter-selection
Aliphatic group	Gly(G)	✓	+	+
	Ala(A)	✓	+	+
	Val(V)	✓	+	+
	Leu(L)	✓	+	+
	Ile(I)	✓	+	+
Acidic and amide group	Asp(D)	✓	—	—
	Asn(N)	✓	+	+
	Glu(E)	✓	+	+
	Gln(Q)	✓	+	+
Basic group	His(H)	✓	+	+
	Lys(K)	✓	+	+
	Arg(R)	✓	—	—
Hydroxyl-group	Ser(S)	✓	+	+
	Thr(T)	✓	—	—
Sulfur-containing	Cys(C)	✓	+	+
	Met(M)	✓	+	+
Aromatic group	Trp(W)	✓	+	+
	Tyr(Y)	✓	+	+
Imino	Pro(P)	✓	+	+

《表 3-7》酵母菌 ERG7^{F528X} 功能性篩選表

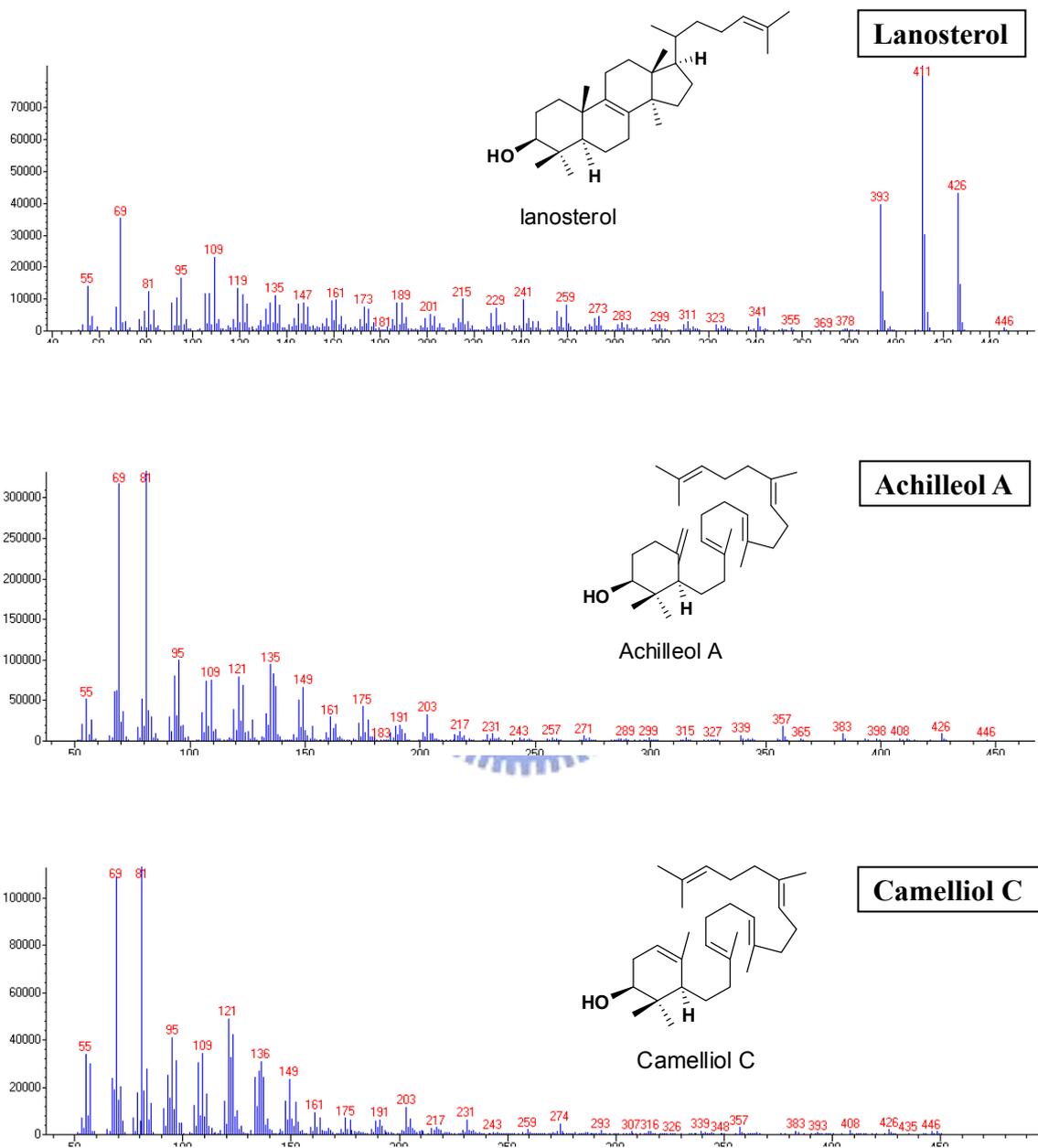
3.3.3 ERG7^{F528X} 突變株產物分析

經過功能性篩選後，我們利用與第 3.1.3 章節相同的方法來進行 ERG7^{F528X} 突變株的產物分析，並由 GC-MS 來鑒定產物《圖 3-14》與分析產物的比例《表 3-8》。

從這張表看起來，大部分的產物都是以羊毛硬脂醇為主，另外還有幾個胺基酸會產生少量的單環產物 Achilleol A 與 Camelliol C。另外，在三個會使酵素失去活性的胺基酸則是都沒有產物的生成。

Substitutions for Phe528	Products percentages (%)			
	lanosterol	Achilleol A	Camelliol C	
Aliphatic Group	Gly(G)	73.7	19.7	6.6
	Ala(A)	81.0	16.0	3.0
	Val(V)	100		
	Leu(L)	100		
	Ile(I)	93.4	6.6	0
Acidic and amide group	Asp(D)	No product		
	Asn(N)	100		
	Glu(E)	100		
	Gln(Q)	92.9	7.1	0
Basic group	His(H)	100		
	Lys(K)	100		
	Arg(R)	No product		
Hydroxyl-Group	Ser(S)	100		
	Thr(T)	No product		
Sulfur-containing	Cys(C)	100		
	Met(M)	92.4	7.6	0
Aromatic Group	Trp(W)	100		
	Tyr(Y)	80.3	19.7	0
Imino	Pro(P)	100		

《表 3-8》酵母菌 ERG7^{F528X} 產物分析表

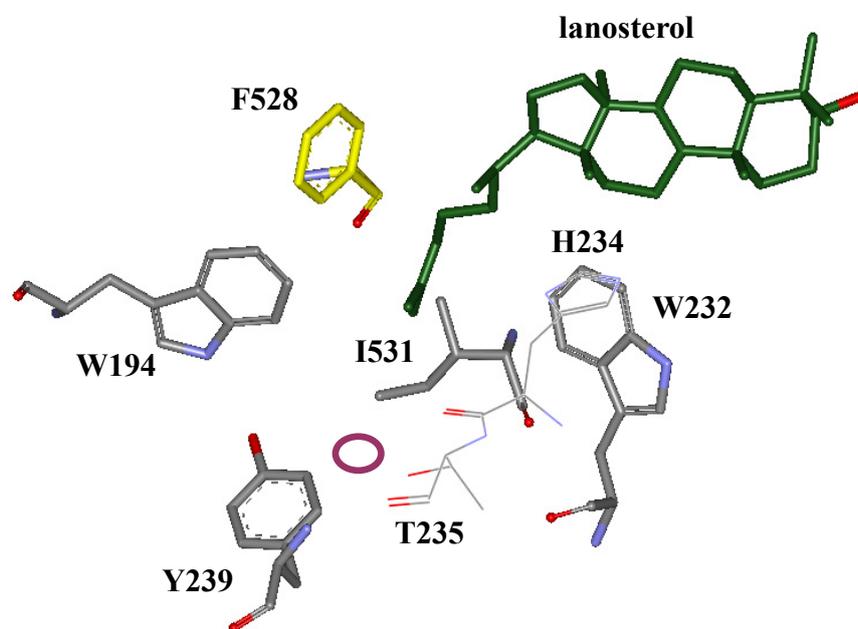


《圖 3-14》酵母菌 $ERG7^{F528X}$ 產物質譜與其結構對照圖

3.3.4 ERG7^{F528X} 突變株電腦模擬分析

在 ERG7^{F528X} 突變株電腦模擬分析方面，我們使用與第 3.1.4 章節中所述的相同的方式，並利用國家高速網路中心的化學軟體資料庫與其應用程式來進行野生型酵母菌 ERG7 與其突變株的電腦模擬。在先前細菌 SHC 與人類 OSC 的結晶結構中，Phe528 都被認為可能會影響最後骨架重排與脫氫作用的過程，不過在我們的產物中並沒有發現類似的生成物。另外，在人類 OSC 中，Phe528 還被認為是總成受質進入酵素的環狀通道胺基酸之一，這也將會是接下來我們討論的重點。

下圖為野生型酵母菌 ERG7 的空間結構模擬圖，這張圖列出了假設受質孔道（紫色）附近的一些胺基酸，這些胺基酸被認為是構成受質進入酵素的通道，所以若在 Phe528 進行突變可能會改變通道構型而影響受質進入酵素。

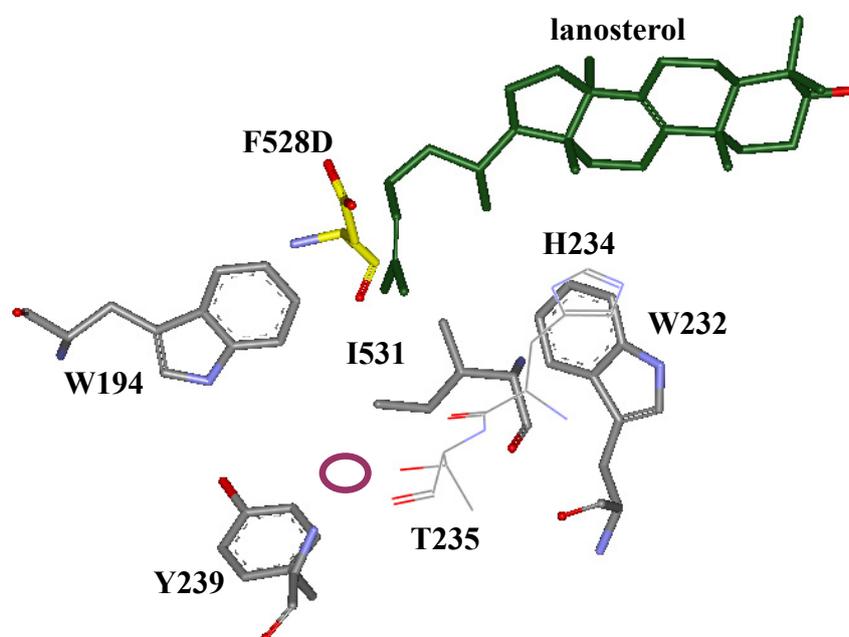


《圖 3-15》野生型酵母菌 ERG7 與位在受質通道口附近胺基酸結構模擬圖

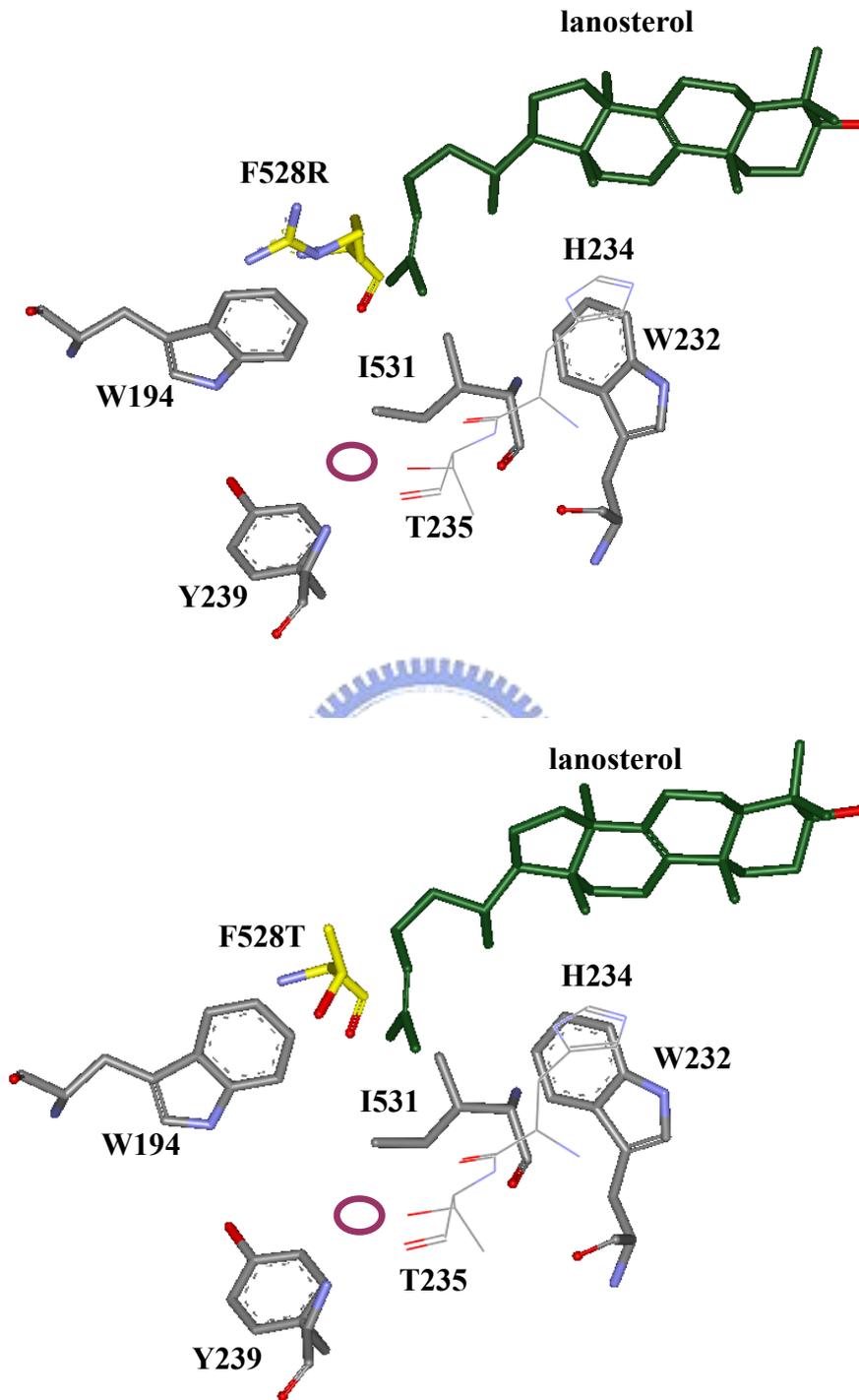
3.3.4.1 Phe528 在受質通道扮演的角色

在酵母菌 ERG7 的假設活性區域的尾端部分，所具有的芳香族性胺基酸相對地較為稀少，在加上之前研究認為 Phe528 對於骨架重排與脫氫作用可能會有影響，所以我們本來推測若在這個胺基酸進上行突變可能可以得到類似的產物，不過從我們的產物分析結果看來似乎並非如此，所以我們認為 Phe528 的功能可能與受質通道有關。

在下面三張圖中分別顯示了在三個會使酵素失去活性的突變株 ERG7^{F528D}、ERG7^{F528R} 與 ERG7^{F528T} 中其在假設受質孔洞附近的胺基酸之空間相對位置《圖 3-16》《圖 3-17》。從結構上來看，這三個突變株與野生型酵母菌 ERG7 並沒有太大的改變；若從胺基酸特性來看，Asp 與 Arg 分別為最強的酸性與鹼性胺基酸。在受質的通道中，最重要的是維持一個穩定的狀態，所以當裡面的胺基酸突變成為強酸或強鹼時可能會改變通道的 pH 值或是極性，進而使受質無法進入酵素活性區域中，才會沒有任何產物生成。



《圖 3-16》酵母菌突變株 ERG7^{F528D} 與附近胺基酸結構模擬圖



《圖 3-17》 A. 酵母菌突變株 ERG7^{F528R} 與附近胺基酸結構模擬圖
 B. 酵母菌突變株 ERG7^{F528T} 與附近胺基酸結構模擬圖

另外，在 ERG7^{F528T} 的突變株中，由於 Thr 並非強酸或強鹼性胺基酸，而與其同類型的胺基酸也不會使酵素失去活性，我們從《圖 3-17》的電腦模擬圖中也沒有發現太大的結構改變，所以目前 ERG7^{F528T} 會使酵素失去活性的原因尚不清楚。而 Phe528 的空間位置位於受質尾部下端，在其他的胺基酸突變點中卻會得到少許單環產物 Achilleol A 與 Camelliol C 的原因，我們推測可能是因為突變過後會些微影響了整個酵素的結構而導致有少許的受質行成單環的產物。我們也期待未來，酵母菌 ERG7 環化酵素可以被大量表現純化，進而進行 X-ray 結晶結構與酵素動力學的實驗分析，將可以對整個酵素有更進一步的了解。



第四章 結 論

在整個論文研究中，我們主要是利用定點飽和突變的技術來進行酵母菌具 ERG7 中其活性區域的假設活性胺基酸的功能性研究。透過 QuikChange PCR 我們得以建構 ERG7^{W390X}、ERG7^{W587X} 與 ERG7^{W528X} 的三個胺基酸的定點飽和突變株，進而進行突變產物的分析。

這三個胺基酸都對酵素具有特殊的功能，特別是 Trp390 與 Trp587 更是酵母菌 ERG7 中不可或缺的重要胺基酸。它們影響受質進入酵素的通道與整個催化過程中，包括 A 環與 C 環的形成，還有藉由與胺基酸的交互作用來影響骨架重排與脫氫步驟。以下將對本篇研究作一個整理與總結。

4.1 酵母菌 ERG7^{W390X} 功能性分析

- (1) 在酵母菌 ERG7^{W390X} 的功能性篩選中，除了 W390G、W390I、W390H、W390K、W390R、W390M 與 W390P 會使酵素失去活性以外，其餘的突變株都可以互補或部分互補原本 Trp390 的功能。
- (2) 在 W390G、W390H、W390K 與 W390R 四個突變株中都沒有得到任何產物，經過電腦模擬發現，在突變成 Gly 後與 C-2 的距離會加大到 7.6Å 因而使得在開環之後無法穩定 C-2 碳陽離子，所以沒有產物生成；亦或許是因為突變過後造成 Asp456 轉向因而影響開環反應。另外，在 W390H、W390K 與 W390R 中，則是因為 His、Lys 與 Arg 皆為帶正電荷的胺基酸，可能會與提供質子開環的 Asp456 和開環之後的氫氧基質子互相排斥推擠，因而促使反應終止。

- (3) 在 W390I、W390M 與 W390P 的突變株中，會使得在 A 環形成時的 C-6 碳陽離子遠離取代胺基酸的位置（距離分別為 7.8Å、6.9Å 與 8.4Å），進而形成單環產物。另外，W390N、W390E、W390T、W390C、W390F、W390Y 可能也是因為類似原因而在羊毛硬脂醇之外，額外生成單環產物。
- (4) 總合以上的實驗與電腦模擬結果，Trp390 在酵素內所具有的功能除了穩定 A 環的形成以外，對於開環反應與開環之後的反應也有會有很大的影響，是一個在催化反應初期十分重要的胺基酸。

4.2 酵母菌 $ERG7^{W587X}$ 功能性分析

- (1) 在酵母菌 $ERG7^{W587X}$ 的功能性篩選的結果中，很令人感到興趣的是只有 W587Y 與 W587F 可以互補 Trp587 的部份功能，其餘的 17 種胺基酸突變株都會使得酵素完全失去活性。
- (2) 從產物分析表中，可以發現 17 個會使酵素失去活性的胺基酸都沒有產生任何的產物，這可能是因為酵素需要芳香族胺基酸其側鏈的苯環作為辨認受質之用，所以除了芳香族胺基酸 Tyr 與 Phe 以外，所有的胺基酸突變株都會因為無法辨認受質而導致酵素失去活性。
- (3) 在 W587Y 的突變株中，其苯環並不像其他在野生型酵母菌 $ERG7$ 中的 Tyr 大部分都是指向受質，而是以其苯環面對受質，這使得突變株仍然可以辨認受質不致於失去活性。而在整個環化反應結束後在行骨架的重排時，此突變株中會因為會影響到胺基酸 Tyr99 與 C-13 的相對應距離而會生成

protosta-12(13),24-dien-3 β -ol。最後當骨架重排形成 lanosteryl C-8/C-9 碳陽離子後則會因不同的脫氫作用進一步地產生羊毛硬脂醇與 parkeol。

(4) 若將 Trp587 突變成 Phe，同樣地會因為其仍然具有苯環的部份，因而可以辨認受質，所以酵素不會失去活性。而 W587F 也會因為相似的原因而產生 protosta-12(13),24-dien-3 β -ol、羊毛硬脂醇與 parkeol。不過在 W587F 突變株中，Y99 改變的角度更大，因而進一步影響到形成 C 環的 C-14 碳陽離子而生成依反瑪可尼可夫法則的 6-6-5 圓環的三環產物 (13 α H) isomalabarica-14(26),17E,21-trien-3 β -ol。另外，W587F 突變株中，Phe699 也會受到較大的影響，而改變其與 C-17 碳陽離子的角度與距離因而影響骨架重排反應而形成 protosta-13(17),24-dien-3 β -ol。

(5) 綜合以上幾點，Trp587 在酵母菌 ERG7 中扮演著連接受質的重要角色，它是利用其胺基酸側鏈上的苯環來辨認受質。而在環化過程中，它也可能會利用碳陽離子- π 電子的共振作用來穩定 A 環與 B 環的形成過程。另外，將 Trp587 突變成 Tyr 與 Phe 則會造成附近的重要胺基酸如 Y99 與 F699 的空間結構產生改變，進而影響整個環化與骨架重排過程，因而形成三環與四環的產物。

4.3 酵母菌 ERG7^{F528X} 功能性分析

(1) 在麥角固醇補充與反向篩選的結果中，只有 F528D、F528R 與 F528T 無法互補酵素正常功能，使酵素完全失去活性。其餘的胺基酸都可以使酵素仍然具有正常的功能。

- (2) 在 16 個可以互補酵素功能的胺基酸中，有六個胺基酸 F528G、F528A、F528I、F528Q、F528M 與 F528Y 突變株會連帶產生單環產物 Achilleol A 與 Camelliol C，不過其產量都十分微量，推測可能是因為突變過後些微影響整體空間結構所造成。
- (3) 在突變株 F528D、F528R 與 F528T 中，從電腦模擬結果來看其空間結構的改變並不是很大，但 Asp 與 Arg 分別為最強的酸性與鹼性胺基酸，所以我們推測可能是因此而影響受質通道的電性與極性，所以造成受質無法進入酵素中而失去活性。至於 Thr 突變株，目前可能的原因尚不清楚，還需要進一步的實驗來證明之。
- (4) Phe528 這個胺基酸在酵素中所具有的功能，從我們的實驗結果來看，應該與最後骨架重排或是脫氫反應較無關連。不過，Phe528 位於假設受質通道的胺基酸上，所以可能可以影響整個受質孔道的穩定。

第五章 未來展望

在我們的論文中，我們利用定點飽和突變的方式來研究酵母菌 ERG7 中其胺基酸 Trp390、Trp587 與 Phe528 在酵素中對於結構和催化機制的影響，我們發現它們分別對於 A 環、C 環、骨架重排還有受質通道具有一定的影響。其中，Trp587 與 Tyr99 和 Phe699 間的交互作用也讓我們感到十分有趣，所以在未來我們會利用多點突變的實驗方式進行三者的雙定點突變分析與三定點突變分析，來觀察其產物比例與變化。

我們也正在努力建構 HEM1、ERG7 與 ERG1 基因缺陷的酵母菌突變株，其中 ERG1 為將鯊烯氧化生成氧化鯊烯的酵素。這個突變株可以讓我們另外添加受質進行突變株的體外 (in vitro) 分析實驗，這樣可以避免下游酵素的影響讓我們得到更多詳細的資訊。另外一個我們一直努力的方向則是將氧化鯊烯環化酵素進行大量表現與純化，若可以得到大量的蛋白質我們就可以進行酵素動力學的研究與蛋白質 X-ray 結晶結構的分析，這將使我們對於氧化鯊烯環化酵素有更進一步的了解。

第六章 參考文獻

1. Allayee, H.; Laffitte, B. A.; Lusis, A. J., Biochemistry. An absorbing study of cholesterol. *Science* **2000**, 290, 1709-1711.
2. Vance, D. E.; Van den Bosch, H., Cholesterol in the year 2000. *Biochim Biophys Acta* **2000**, 1529, 1-8.
3. T. Schulz-Gasch, M. Stahl, *J Comput Chem* **2003**, 24, 741-753.
4. Harvey, P. C. C. a. R. A., *Lippincotts Illustrated Review Biochemistry*. Lippincott Williams & Wilkins, **2001**, 173-185.
5. Simons, K.; Toomre, D., Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2000**, 1, 31-39.
6. Simons, K.; Ehehalt, R., Cholesterol, lipid rafts, and disease. *J Clin Invest* **2002**, 110, 597-603.
7. V. Quesney-Huneus, H. A. Galick, M. D. Siperstein, S. K. Erickson, T. A. Spencer, J. A. Nelson, *J Biol Chem* **1983**, 258, 378-385.
8. V. Quesney-Huneus, M. H. Wiley, M. D. Siperstein, *Proc Natl Acad. Sci USA*. **1979**, 76, 5056-5060
9. Chugh, A.; Ray, A.; Gupta, J. B., Squalene epoxidase as hypocholesterolemic drug target revisited. *Prog Lipid Res* **2003**, 42, 37-50.
10. Dougherty, D. A., Cation- π interactions in chemistry and biology: a new view of benzene, Phe, Tyr, and Trp. *Science* **1996**, 271, 163-168
11. Grundy, S. M., HMG-CoA reductase inhibitors for treatment of hypercholesterolemia. *N Engl J Med* **1988**, 319, 24-33.
12. T. Dang, I. Abe, Y. F. Zheng, G. D. Prestwich, *Chem Biol* **1999**, 6, 333-341.
13. B. DiDomenico, *Curr Opin Microbiol* **1999**, 2, 509-515.
14. P. C. C. a. R. A. Harvey, *Lippincotts Illustrated Review Biochemistry*, Lippincott Williams & Wilkins, **2001**. 173-185.
15. I. Abe, Y. F. Zheng, G. D. Prestwich, *Biochemistry* **1998**, 37,

5779-5784.

- 16.R. Xu, G. C. Fazio, S. P. Matsuda, *Phytochemistry* **2004**, *65*, 261-291.
- 17.I. Abe, M. Rohmer, G. D. Prestwich, *Chem. Rev.* **1993**, *93*, 2189-2206.
- 18.J. A. Zoltewicz, N. M. Maier, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 4985-4990.
- 19.P. C. Miklis, R. Ditchfield, T. A. Spencer, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 10482-10489.
- 20.J. P. Gallivan, D. A. Dougherty, *Proc Natl Acad Sci U S A* **1999**, *96*, 9459-9464.
- 21.H. S. Robinson, *J Natl Med Assoc* **1970**, *62*, 474-480.
- 22.D. H. Barton, M. J. Day, R. H. Hesse, M. M. Pechet, *J Chem Soc [Perkin 1]* **1975**, 2252-2256.
- 23.E. J. Corey, S. C. Virgil, *J. Am. Chem. SOC.* **1991**, *113*, 4025-4026.
- 24.P. G. Barton, F. D. Gunstone, *J Biol Chem* **1975**, *250*, 4470-4476.
- 25.B. robustell, I. Abe, G. D. prestwich, *tetrahedron letters* **1998**, *39*, 957-960.
- 26.B. J.robustell, I. Abe, G. D. prestwich, *tetrahedron letters* **1998**, *39*, 9385-9388.
- 27.E. J. Corey, D. D. Staas, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 3526-3530.
- 28.E. J. Corey, H. Cheng, C. H. Baker, S. P. T. Matsuda, D. Li, X. Song, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 1277-1288.
- 29.E. J. Corey, C. H. B. Hengmiao Cheng, S. P. T. Matsuda, D. Li, X. Song, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 1289-1298.
- 30.J. Corsino, P. R. de Carvalho, M. J. Kato, L. R. Latorre, O. M. Oliveira, A. R. Araujo, V. D. Bolzani, S. C. Franca, A. M. Pereira, M. Furlan, *Phytochemistry* **2000**, *55*, 741-748.
- 31.E. J. Corey, S. P. Matsuda, C. H. Baker, A. Y. Ting, H. Cheng, *Biochem Biophys Res Commun* **1996**, *219*, 327-331.
- 32.W. S. Johnson, S. D. Lindell, J. Steele, *J. Am. Chem. SOC.* **1987**, *109*, 5852-5853.

33. W. S. Johnson, S. J. Telfer, S. Cheng, U. Schubert, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 2517-2518.
34. R. J. Griffin, M. F. Stevens, *Anticancer Drug Des* **1992**, *7*, 443-449.
35. R. Thoma, T. Schulz-Gasch, B. D'Arcy, J. Benz, J. Aebi, H. Dehmlow, M. Hennig, M. Stihle, A. Ruf, *Nature* **2004**, *432*, 118-122.
36. K. U. Wendt, K. Poralla, G. E. Schulz, *Science* **1997**, *277*, 1811-1815.
37. P. Milla, A. Lenhart, G. Grosa, F. Viola, W. A. Weihofen, G. E. Schulz, G. Balliano, *Eur J Biochem* **2002**, *269*, 2108-2116.
38. T. Hoshino, K. Shimizu, T. Sato, *Angew Chem Int Ed Engl* **2004**, *43*, 6700-6703.
39. K. U. Wendt, A. Lenhart, G. E. Schulz, *J. Mol. Biol.* **1999**, *286*, 175-187
40. I. Abe, M. Bai, X. Y. Xiao, G. D. Prestwich, *Biochem Biophys Res Commun* **1992**, *187*, 32-38.
41. E. J. Corey, H. Cheng, C. H. Baker, S. P. T. Matsuda, D. Li, X. Song, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 1277-1288.
42. E. E. Van Tamelen, J. Willet, M. Schwartz, R. Nadeau, *J Am Chem Soc* **1966**, *88*, 5937-5938.
43. M. J. Segura, B. E. Jackson, S. P. Matsuda, *Nat Prod Rep* **2003**, *20*, 304-317.
44. K. U. Wendt, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 3946-3955.
45. K. U. Wendt, A. Lenhart, G. E. Schulz, *J. Mol. Biol.* **1999**, *286*, 175-187.
46. E. J. Corey, D. D. Staas, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 3526-3527.
47. C. Jenson, W. L. Joergensen *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 10846-10854.
48. B. A. Hess *Org. Lett.* **2003**, *5*, 165-169.
49. B. A. Hess *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 10286-10287.
50. D. Gao, Y.-K. Pan, K. Byun, J. Gao *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 4045-4046.

51. B. M. Joubert, L. Hua, S. P. T. Matsuda *Org. Lett.* **2000**, *2*, 339-345.
52. T. K. Wu, Y. T. Liu, F. H. Chiu, C. H. Chang *Org. Lett.* **2006**, *21*, 4691-4696.
53. K. U. Wendt, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 3966-3972.
54. E. J. Corey, S. C. Virgil, H. Cheng, C. H. Baker, S. P. T. Matsuda, V. Sigh, S. Sarshar *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 11819-11825.
55. C. Jenson, W. L. Joergensen *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 10846-10854.
56. B. A. Hess, Jr., *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, *124*, 10286-10287.
57. B. A. Hess, Jr., *Org. Lett.*, **2003**, *5*, 165-169.
58. I. Abe, *Nat. Prod. Rep.*, **2007**, *24*, 1311-1331.
59. T. K. Wu, Y. T. Liu, C. H. Chang *ChemBioChem* **2005**, *6*, 1177-1181.
60. T. K. Wu, Y. T. Liu, C. H. Chang, M. T. Yu, H. J. Wang *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *128*, 6414-6419.
61. T. K. Wu, C. H. Chang *ChemBioChem* **2004**, *5*, 1712-1715.
62. S. Lodeiro, W. K. Wilson, H. Shan, S. P. T. Matsuda *Org. Lett.* **2006**, *8*, 439-442.
63. T. K. Wu, M. T. Yu, Y. T. Liu, C. H. Chang, H. J. Wang, E. W. G. Diau *Org. Lett.* **2006**, *8*, 1319-1322.
64. K. U. Wendt, G. E. Schulz, E. J. Corey, D. R. Liu, *Angew Chem Int Ed Engl* **2000**, *39*, 2812-2833.
65. W. K. W. Jennifer B. R. Herrera, and Seiichi P. T. Matsuda, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 6765-6766.
66. E. A. Hart, L. Hua, L. B. Darr, W. K. Wilson, J. Pang and S. P. T. Matsuda *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 9887-9888.
67. S. Lodeiro, M. J. R. Segura, M. Stahl, T. Schulz-Gasch, S. P. T. Matsuda *ChemBioChem* **2004**, *5*, 1581-1589.
68. S. Lodeiro, T. Schulz-Gasch, S. P. T. Matsuda *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 14132-14133.
69. J. B. R. Herrera, W. K. Wilson, S. P. T. Matsuda *J. Am. Chem. Soc.*

- 2000, 122, 6765-6766.
70. T. Hoshino, T. Sato *Chem. Commun.* **2002**, 291-301.
71. T. Merkofer, C. Pale-Grosdemange, K. U. Wendt, M. Rohmer, K. Poralla *Tetra. Lett.* **1999**, 40, 2121-2124.
72. D. J. Reinert, G. Balliano, G. E. Schulz *Chem. Biol.* **2004**, 11, 121-126.
73. Sato T, Hoshino T. *Biosci Biotechnol Biochem.* **1999**, 63, 1171-1180
74. Christine Full, Karl Poralla *FEMS Microbiology Letters.* **2000**, 183, 221-224
75. Sato T, Hoshino T, Abe T. *Chem. Commun.* **1998**, 2617-2618
76. Rajamani R, Gao J. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 12768-12781
77. 李文暄, 利用飽和定點突變方法研究酵母菌氧化鯊烯環化酵素內的假設活性區胺基酸對於催化環化/重組反應的影響. 碩士論文, 國立交通大學生物科技研究所 **2007**.
78. 溫皓宇, 利用飽和定點突變對氧化鯊烯環化酵素內假設活性區域殘基進行結構—反應關係之研究. 碩士論文, 國立交通大學生物科技研究所 **2007**.
79. Suzuki M, Xiang T. *Plant Cell Physiol.* **2006**, 47, 565-571

附錄

引子的設計

(1) 突變用引子

WSS-OSCW587D - <i>Bam</i> H I 1	5'- ggT ATg <u>gAT CCg</u> ATg gTA TTT gTT TTA CAT ATg C -3' <i>Bam</i> H I
WSS-OSCF528G W - <i>Pvu</i> II 1	5'-CTT gAA TCC <u>AgC TgC</u> TgA AgT TKg ggg TAA CAT AAT gg -3' <i>Pvu</i> II
WSS-OSCF528H - <i>Pvu</i> II 1	5'-CTT gAA TCC <u>AgC TgC</u> TgA AgT TCA Cgg TAA CAT AAT gg -3' <i>Pvu</i> II
WSS-OSCF528A E- <i>Pvu</i> II 1	5'-CTT gAA TCC <u>AgC TgC</u> TgA AgT TgM ggg TAA CAT AAT gg -3' <i>Pvu</i> II
WSS-OSCW390H YC- <i>Kpn</i> I 1	5' -CCA TTA Tgg gTA CCA ATg gTg TgC AAA CCY RCg ATT gTg Cg- 3' <i>Kpn</i> I
WSS-OSCW390K ND- <i>Kpn</i> I 1	5' -CCA TTA Tgg gTA CCA ATg gTg TgC AAA CCR AWg ATT gTg Cg- 3' <i>Kpn</i> I
WSS-OSCW390I M- <i>Kpn</i> I 1	5' -CCA TTA Tgg gTA CCA ATg gTg TgC AAA CCA TRg ATT gTg Cg- 3' <i>Kpn</i> I

(2) 定序用引子

WSS-OSCF528K- <i>Pvu</i> II I 2	5'- CCA TTA TgT TAC CTT TAA CTT <u>CAg CTg</u> gAT TCA Ag -3' <i>Pvu</i> II
WSS-OSCF528K - <i>Pvu</i> II 1	5'-CTT gAA TCC <u>AgC TgC</u> TgA AgT TAA Agg TAA CAT AAT gg -3' <i>Pvu</i> II
WSS-OSCW390Y - <i>Kpn</i> I 1	5' -CCA TTA Tgg gTA CCA ATg gTg TgC AAA CCT ATg ATT gTg Cg- 3' <i>Kpn</i> I