


# 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式對於氧化鯊烯環化酵素內  
假設活性區域殘基進行結構與反應關係之研究



**Studies of Structure-Reactivity Relationships on  
Putative Active Site Cavity Residues of  
Oxidosqualene-Lanosterol Cyclase by  
Site-Saturated Mutagenesis**

研究生：胡天昶

指導教授：吳東昆 博士

中華民國 九十八年七月

利用定點飽和突變的方式對於氧化鯊烯環化酵素內  
假設活性區域殘基進行結構與反應關係之研究

**Studies of Structure-Reactivity Relationships on  
Putative Active Site Cavity Residues of  
Oxidosqualene-Lanosterol Cyclase by  
Site-Saturated Mutagenesis**

研究生：胡天昶

Student: Tain-Chang Hu

指導教授：吳東昆 博士

Advisor: Prof. Tung-Kung Wu Ph.D



**A Manuscript of Dissertation  
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 of Philosophy  
in  
Biological Science and Technology Hsinchu,  
Taiwan, Republic of China  
July, 2009**

中華民國九十八年七月

# 利用定點飽和突變的方式對於氧化鯊烯環化酵素內 假設活性區域殘基進行結構與反應關係之研究

學生：胡天昶

指導教授：吳東昆 博士

## 摘要

在動物、真菌以及高等植物中的氧化鯊烯環化酵素會催化氧化鯊烯形成四環或是五環的三萜類化合物。由於這種酵素只需要一個步驟就可以完成複雜的環化以及重排反應，近半世紀以來引起科學家極大的興趣。

在1992年，Griffin提出芳香族的胺基酸可以利用其 $\pi$ 電子來穩定中間產物所產生的碳陽離子，故芳香族胺基酸為重要殘基的可能扮演著十分重要的角色。

為了釐清D環上的擴環反應是由哪些高度保留性的胺基酸所影響，我們進行了定點飽和突變，特別是針對*Pisum sativum* 鯊烯環化酵素中的Phe125以及*Saccharomyces cerevisiae* 鯊烯環化酵素中的Met105進行實驗。

在*Saccharomyces cerevisiae* M105定點突變實驗中，在突變成G/A/S/N/Q/K會產生protosta-20,24-dien-3 $\beta$ -ol，藉由這結果的產生，推測M105所扮演的角色是影響重排反應以及脫氫反應的位置，但是並未影響環化反應。而*Pisum sativum* F125定點突變實驗中發現此點是影響酵素的結構以及受質的進出。

# Studies of Structure-Reactivity Relationships on Putative Active Site Cavity Residues of Oxidosqualene-Lanosterol Cyclase By Site-Saturated Mutagenesis

Student: Tain-Chang Hu

Advisor: Dr. Tung-Kung Wu

## Abstract

Oxidosqualene cyclases catalyze the oxidosqualene into tetracyclic or pentacyclic triterpenoids in the animal, fungi and high plants. A serial cyclization / rearrangement cascades catalyzed in one-step reaction by oxidosqualene cyclases have fascinated the bioorganic researcher over a half century.

In 1992, Griffin proposed an aromatic hypothesis for stabilizing the respective carbocationic intermediates via “cation- $\pi$  interaction” from the electron-rich indole ring of tryptophans, phenolic group of tyrosine, or phenylalanine residues within the cyclase active site.

In order to clarify the mechanism of D ring expansion, the highly conserved aromatic amino acid residues in oxidosqualene cyclase, site-saturated mutagenesis experiments on phenylalanine125 residue of *Pisum sativum*(PSY) oxidosqualene cyclase which synthesis  $\beta$ -amyrin were carried out and then compare with the methionine105 residue of *Saccharomyces cerevisiae* oxidosqualene-lanosterol cyclase (ERG7).

The protosta-20,24-dien-3 $\beta$ -ol products were isolated from the ERG7 M105G/A/S/N/Q/K mutants. This result indicated Met105 plays a catalytic role in the influence of rearrangement process and determination of deprotonation position but does not involve intervention in the cyclization steps. The function of Phe125 in *Pisum sativum* oxidosqualene cyclase is to stabilize the enzyme structure for movement of products.

## 誌謝

在經過了兩年專精於生物科技的研究以及外派一年於科管所的學習生涯之中，隨著時間的流逝，學習到的不僅僅是研究想法與知識而已，還學習到人與人彼此間相處的道理；社會正是人類所組成的，在人與人的相處之間，有著知識的交流、研究的傳承、以及情感上的流轉。而在吳老師實驗室的這三年，不論是開心、快樂、悲傷、辛苦、生氣，最終都將在這本論文之中畫下句點，並且永存回憶之中；我很開心能夠在實驗室與這三年之中經歷這一切的一切，因為不論好壞，都是深刻與美好的回憶。

首先，我一定要感謝在我心目中最帥的老師吳東昆，他總是在研究上給我十分多的建議，並且讓我在研究上不會有經費的隱憂，因為做研究實在是很花錢的，如此一來可以讓我放心的去做研究，運用良好的實驗環境以及研究儀器去證明自己的研究想法；說到這裡也要特別感謝美麗的師母賴美伶，不僅僅是因為在系辦辛勞的幫我們處理系上事務，也因為她對於老師無微不至的照顧與陪伴，使得老師在經歷過一些手術之後都能迅速的復元，迅速的投身研究行列，關心我們的實驗，並且讓老師都能擁有好心情以及那靈活逗趣的眉毛！

接下來要感謝的是李耀坤老師、刁維光老師、林敬堯老師和鄭建中老師，十分感謝你們百忙中抽空幫我們審核口試、論文，不論是和藹可親的主持人的李耀坤老師亦或是傳說中大砲的鄭建中老師，都提供很多有利的建議，讓這本論文更加完善，使我感受到身為學術界的人，必當對研究盡心盡力，也許日後學生並非投身於學術界，但是，我想對於任何事物都必須要有這樣的精神，必會謹記於心。

接下來感謝實驗室中永遠的燈塔程翔學長，在我的印象中，你對於學術總有著源源不絕的熱情啊！每天早上總是最早抵達實驗室，泡著一杯熱咖啡，津津有味的看著PAPER，雖然可能因為必須有著學長的高度，對於下面的人管理才會比較方便，所以導致我們沒有很熟識，但是，並不會因為如此而有損於你在我心中的地位；而媛婷學姐則是我研究以及生活上面美麗的天使，擁有著細心的教導、生活上酸甜苦辣的分享、處理事情上的指導與教誨，除了天使之外我還真想不出其它可以形容的名詞呢！一時之間還真難以言盡，否則可能會超過論文本頁數，不如畢業離校之日咱們再促膝長談。此外也感謝豪哥對於GC-Mass上面的維護，因為如此才能使我在實驗上能夠順利的進行；感謝平常很認真很認真默默做實驗的文鴻學長，因為你那擁有安全感的肚子以及實驗上的努力，讓我看到了台灣人的精神；感謝最傑出的運動員晉源學長，正因為天使有了你的陪伴，才顯得喜樂，不再孤單孤獨。感謝裕國學長，在一同郊遊的期間，讓我了解到，原來還有人和我一樣擁有赤子之心，瀑布也敢爬，我想學長在實驗上也勇於突破別人所不敢突破的屏障。感謝小紅和宅宅兩夫婦在實驗室中最後的這一段日子當中，帶給我歡樂與喜悅，使我有看了看盡天下

事、一笑泯恩仇般開闊的心胸，這對於我未來人生的道路，想必是重要的基石。感謝 Mili 使我知道原來印度人其實人都挺好挺好玩的，我都還記得妳說，妳比較喜歡我，沒有比較喜歡育勳，哈哈！也感謝 Allen 讓我了解到當醫生不是這麼簡單的阿，尤其是急診室的主任，壓力一定很大。正因為有學長姐們的廣博知識，使我能增廣見聞，不勝感激。

感謝已經畢業的采婷學姐、文祥學長、文暄學姐、皓宇學長，在剛進實驗室的期間，有妳們的細心教導與帶領，使我對於 OSC 的研究領域更加熟悉。此外也感謝 小高學長，在我剛進入實驗室的這段時間，使我能迅速的熟悉並且融入實驗室當中。

再來感謝陪伴我一起奮鬥的同學們，亦諄讓我體會到在人生中有時傻傻的幸福也是很美好的，並且在實驗中我們也相互的扶持；育勳那傻呼呼的硬頸精神，讓我了解到擁有客家人血統的可敬之處；感謝禕庭能陪我度過那段傷心的時光、採買的時光、玩樂的時光與增肥和減肥，並且讓我充分了解到什麼才叫做工作狂。有了這些好同學，証明除了考上交大進入吳老師實驗室之外我運氣可真好呢！

接下來感謝那些可愛的學弟妹們：感謝呂靜婷讓我在諧星的路上並不孤單，搞笑的時候永遠有妳的陪伴；感謝小花那罐蜆精，使我成為好肝好腎的好男人；感謝涵涵讓我充分了解到身為天秤座那色大膽小的一部分；感謝一起將我的口頭禪發揚光大。有了你們使我在第三年中也一樣開心歡樂，謝謝你們。

對了還有更小的學弟妹們：感謝欣怡那女王般的氣魄，讓我這幼稚鬼有被摸摸頭寵愛的感覺；感謝怡臻的請客，讓我飽餐一頓，還有了解到對於時間的要求，因為在下是個隨興之人，但是我是肯改進的；感謝欣芳那永遠體貼，柔情似水的溫柔，讓我知道什麼才是真正的小媳婦、小女人阿！感謝世穎能陪著我打球，還有讓我真正了解到那師範體系孜孜不倦的教育精神，一定要說到你懂的感覺；感謝那被我弄哭過、弄生氣過的小彥，話說我覺得這還真不簡單啊！有這個性直爽的學妹還挺不錯的，我會記得妳在蘭嶼爬山爬輸我，還有妳是也敢爬瀑布的愛到處玩的死小孩呢！

特別銘謝在我寫論文期間陪伴我的小狗狗老康；感謝科管所的老師都能讓我高分通過，當然這其中包含著報告組員君翰、偉翰、勻薇等人共同的合作，使我在外系中也不孤獨，且充滿歡樂；感謝我的室友老皮，永遠跟我開些白爛的笑話，還有在深夜裡打著永遠是最後一場的電動；感謝陪我打球常向我抱怨的威宇哥，因為和你在一起的時間都是開心的呢；還有...還有那陪伴我到全台各地以及偏遠山區旅遊的珮如，因為妳的陪伴，使我的研究更有動力、衝勁以及效率。

最後感謝我的父母，正因為有你們才能使我衣食無虞，雖然父母總是會忍不住碎碎念的，但是我都能明白體會箇中奧妙的，你們真的都是為了我好啊！放心，不會讓你們失望的。

謹以此文寥寥數語敘述心中之百感千思

# 目錄

摘要	I
Abstract	II
誌謝	III
目錄	V
圖目錄	VIII
表目錄	XI
第一章 序論	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	4
1.1.2 膽固醇的生合成途徑	5
1.2 三萜類環化酵素家族的簡介	8
1.2.1 三萜類產物的多樣性與特異性	9
1.3 氧化鯊烯環化酵素家族的簡介	11
1.4 各物種間多樣性三萜類產物反應機構	15
1.4.1 鯊烯-蛇麻烯環化酵素 (SHC)	16
1.4.2 氧化鯊烯-羊毛硬脂醇環化酵素 (OSC)	23
1.4.2.1 氧化鯊烯環化酵素受質穩定之假說	24
1.4.2.2 氧化鯊烯環化酵素的環化機制	26
1.4.2.3 人類氧化鯊烯-羊毛硬脂醇環化酵素 (OSC)	27
1.4.2.4 氧化鯊烯-羊毛硬脂醇環化酵素 OSC 各反應步驟探討	30
1.4.3 氧化鯊烯-環阿屯醇環化酵素 (CAS)	40

1.4.4 氧化鯊烯-羽扇醇合成酵素與 $\beta$ -香桂素合成酵素 (LUP & BAS).....	45
1.5 氧化鯊烯環化酵素之胺基酸序列比對.....	49
1.6 研究目的.....	54
第二章 實驗材料與方法.....	62
2.1 實驗材料.....	62
2.1.1 化學藥品與材料.....	62
2.1.2 實驗套組.....	65
2.1.2.1 定序套組.....	65
2.1.2.2 質體取得套組.....	65
2.1.3 菌珠與載體.....	65
2.1.4 培養液與緩衝液.....	66
2.1.5 實驗儀器.....	70
2.2 實驗方法.....	72
2.2.1 重組質體的建構.....	72
2.2.2 酵母菌珠 TKW14C2 與 CBY57 的電穿孔作用.....	78
2.2.3 功能性補充活性篩選.....	79
2.2.4 酵母菌的培養.....	81
2.2.5 非皂化脂質的萃取.....	82
2.2.6 管柱液相色層分析.....	83
2.2.7 薄層色層分析 (Thin Layer Chromatography).....	83
2.2.8 氣相層析/質譜儀 (GC/MS) 的條件.....	84
2.2.9 突變電腦模擬圖的建構.....	85



第三章 實驗結果與討論.....	86
3.1 酵母菌 $ERG7^{M105F+H234G/A/Y}$ 功能性分析 .....	86
3.1.1 建構 $ERG7^{M105F+H234G/A/Y}$ 的雙點突變株.....	86
3.1.2 $ERG7^{M105F+H234G/A/Y}$ 突變株功能性補充篩選以及 析與討論.....	86
3.2 酵母菌 $ERG7^{M105X}$ 功能性分析 .....	89
3.2.1 建構 $ERG7^{M105X}$ 飽和定點突變株.....	89
3.2.2 $ERG7^{M105X}$ 突變株功能性補充篩選以及 討論.....	90
3.3 <i>P.sativum</i> $PSY^{F125}$ 功能性分析.....	95
3.3.1 建構 $PSY^{F125}$ 飽和定點突變株.....	95
3.3.2 $PSY^{F125X}$ 突變株功能性補充篩選以及產物分析與 討論.....	95
第四章 結論.....	102
4.1 酵母菌 $ERG7^{M105F+H234G/A/Y}$ 功能性分析.....	102
4.2 酵母菌 $ERG7^{M105X}$ 功能性分析 .....	103
4.3 <i>P.sativum</i> $PSY^{F125X}$ 功能性分析.....	103
第五章 未來展望.....	105
第六章 參考文獻.....	106

# 圖目錄

《圖 1-1》在不同物種中間的固醇類皆具有相似結構.....	2
《圖 1-2》膽固醇的生合成途徑.....	7
《圖 1-3》三萜類環化酵素在不同物種間的特異性.....	10
《圖 1-4》不同物種間的三萜類環化酵素序列比對樹狀圖.....	10
《圖 1-5》氧化鯊烯在酵素內的摺疊方式與其產物途徑.....	15
《圖 1-6》SHC 的環化機制與 OSC 十分類似.....	17
《圖 1-7》SHC 之 X-射線晶體結構圖。C：胺基酸的 COOH 端；N： NH <sub>2</sub> 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 1600Å <sup>2</sup> 並被認為是受質進入的通道 (Entrance Channel)。紅色與黃色緞帶構形為 $\alpha$ -Helix 的結構； 綠色為 $\beta$ 結構；紫色為 QW-Motifs 之重複區域。.....	18
《圖 1-8》藉由抑制劑 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 <sup>15</sup> .....	19
《圖 1-9》利用 X-ray 推斷 SHC 可能的活性區域 <sup>32</sup> .....	20
《圖 1-10》SHC 活性區域內假設活性胺基酸的位置與功能 <sup>36</sup> .....	22
《圖 1-11》SHC 各突變點產物分布圖 <sup>33</sup> .....	23
《圖 1-12》Johnson 提出的理論模型 Johnson Model <sup>38,39</sup> .....	25
《圖 1-13》Griffin 所提出的 Aromatic Hypothesis 理論模組 <sup>40</sup> .....	26
《圖 1-14》OSC 催化氧化鯊烯形成羊毛硬脂醇的環化機制.....	27
《圖 1-15》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 <sup>41</sup> .....	29
《圖 1-16》人類 OSC 與膜結合時的構形，圖中黑色為抑制劑 Ro48-8071	

.....	29
《圖 1-17》 a. 酵母菌 OSC 假設開環環化機制 <sup>43</sup> b. 人類 OSC 開環 環化機制 <sup>45,46</sup> .....	31
《圖 1-18》 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 <sup>41</sup> .....	32
《圖 1-19》 利用類似物作為受質結果顯示 C 環會先形成五圓環 .....	34
《圖 1-20》 Hess 認為 C 環與 D 環會經由過渡態之後同時形成 <sup>61</sup> .....	34
《圖 1-21》具有高度保留性的芳香族性胺氨基酸 Trp192、Trp230、His232、 Tyr237、Tyr503、Phe521 與 Phe696 可以利用碳陽離子與 $\pi$ 電 子共振交互作用去穩定甲基與氫化基的骨架重排 <sup>41</sup> 。 .....	36
《圖 1-22》 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 <sup>41</sup> 。 .....	37
《圖 1-23》 H234 定點飽和突變的產物 <sup>62</sup> .....	39
《圖 1-24》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 <sup>70</sup> .....	41
《圖 1-25》 阿拉伯芥 CAS 定點突變產物結構圖 <sup>68</sup> .....	44
《圖 1-26》 酵素催化氧化鯊烯而形成達瑪烯碳陽離子中間物以及原脂 醇碳陽離子中間物.....	47
《圖 1-27》 飽合定點突變實驗中 PNY 的 Tyr261H 所產生的三種產物 .....	49
《圖 1-28》 <i>P.sativum</i> 的 BAS、 <i>O.Europa</i> 的 LUP、阿拉伯芥( <i>A.Thaliana</i> ) 之 CAS、阿拉伯芥 ( <i>A.Thaliana</i> ) LAS、人類 ( <i>H.sapiens</i> ) 之 OSC 以及酵母菌 ( <i>S.cerevisiae</i> ) 之 OSC 彼此間序列比對。 ....	53

《圖 1-29》各物種間氧化鯊烯環化酵素相關性研究圖.....	56
《圖 1-30》BAS 反應機制表示圖.....	57
《圖 1-31》OSC 和 BAS 之間反應機制的差異.....	57
《圖 1-32》BAS 結構模擬圖中 C20 周圍之胺基酸.....	58
《圖 1-33》OSC 的結構模擬圖中 C20 周圍之胺基酸.....	59
《圖 1-34》飽合定點突變實驗中 PNY 的 Tyr261H 所產生的三種產物 左邊兩種異構產物即可發現尾端長碳鏈的角度是完全不同的， 因此可推論 H234 過近的距離所造成的立體障礙會使得在 C20 碳陽離子形成之後有著”甩尾”的動作產生，也關係著下一個 步驟為擴環亦或是重排的反應。.....	60
《圖 1-35》不同物種間的序列比對.....	61
《圖 2-1》QuikChange Site-Directed Mutagenesis 示意圖。.....	72
《圖 2-2》產物分析流程示意圖.....	82
《圖 3-1》M105F+H234G 的 GC-MS 圖譜，有少量的 LA.....	88
《圖 3-2》野生型 ERG7 所產生的 GC-Mass 圖譜，有大量 LA.....	88
《圖 3-3》M105G GC-MS 之 protosta-20,24-dien-3 $\beta$ -ol 圖譜.....	92
《圖 3-4》吸熱反應以及放熱反應與自由能關係之示意圖.....	93
《圖 3-5》推測產生 protosta-20,24-dien-3 $\beta$ -ol 的反應機制.....	94
《圖 3-6》F125 周圍的胺基酸以及和 F125 的距離.....	98
《圖 3-7》F125 中苯環的 $\pi$ 電子雲與 Cys370 上的硫原子拉扯兩者中 間之氫原子的相互作用力.....	99
《圖 3-8》PSY 結構圖，藍色為受質，橘色為 C370，綠色為 V371， 黃色為包含 C370 和 V371 的 $\alpha$ -helix.....	101
《圖 3-9》人類 OSC 結晶結構推測受質進出位置(藍色圓圈部分).....	101

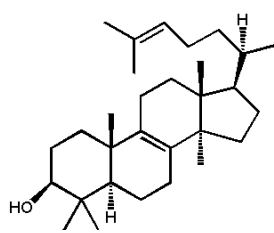
# 表目錄

《表 1-1》阿拉伯芥 CAS 定點突變產物及比例分配表 <sup>68</sup> .....	45
《表 2-1》飽和定點突變之引子設計 .....	73
《表 2-2》QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit 所用材料條件 .....	73
《表 2-3》QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit 所使用之聚合酶 素放大步驟 .....	74
《表 2-4》 <i>Dpn</i> I 酵素切除母股 DNA 產物處理材料條件 .....	74
《表 2-5》特定限制酶鑑定之材料條件 .....	76
《表 2-6》BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit 之材料 .....	77
《表 2-7》BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit 所用溫度 .....	77
《表 3-1》酵母菌 ERG7 <sup>M105F+H234G/A/Y</sup> 功能性篩選與產物分析表 .....	87
《表 3-2》酵母菌 ERG7 <sup>M105F+H234G/A/Y</sup> 功能性篩選與產物分析表 .....	91
《表 3-3》 <i>P.sativum</i> PSYF <sup>125X</sup> 功能性篩選與產物分析表 .....	96
《表 3-4》不同物種間位於 PSY <sup>F125</sup> 位置胺基酸的序列比對 .....	97

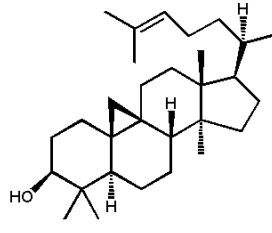
# 第一章 序論

## 1.1 固醇類的生化角色與重要性

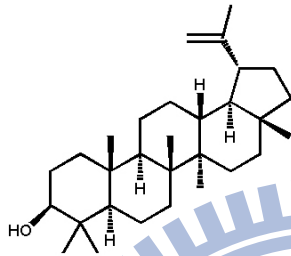
固醇類 (Sterols) 是多環脂醇類物質的通稱，其組成通常具有四至六個環作為其結構的中心骨架，並含有一個長短不一且經由不同官能基修飾之側鏈，同時在其C-3 位置上會有一羥基者稱之。自然界的固醇類普遍存在於動、植物與細菌中，例如：膽固醇 (cholesterol)、麥角固醇 (ergosterol)、 $\beta$ -麥胚固醇 ( $\beta$ -amyrin)、植物固醇 (phytosterol) 以及其生合成代謝途徑中的上游產物及其衍生物，彼此間皆具有十分相似的結構《圖1-1》；由於在大多數的真核細胞中，固醇類物質扮演著細胞膜組成及生理調控的重要角色<sup>1</sup>，所以固醇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



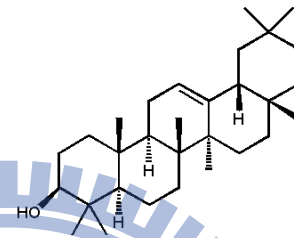
Lanosterol



Cycloartenol



Lupenol



$\beta$ -Amyrin

《圖1-1》在不同物種中間的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<sup>2</sup>。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<sup>3</sup>。另外，膽固醇也是膽汁、固醇類荷爾蒙、維生素D<sub>3</sub>、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D<sub>3</sub>，而維生素D<sub>3</sub>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<sup>4</sup>。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<sup>5</sup>。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<sup>6</sup>。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<sup>7,8</sup>。



### 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

簡單來說 HDL 對人體來說是好的膽固醇；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 apoB (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<sup>9-11</sup>。另外，在黴菌中，固醇類生合成途徑的最終產物—麥角固醇(Ergosterol)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，用以發展降膽固醇及抗黴菌的藥物<sup>12,13</sup>。

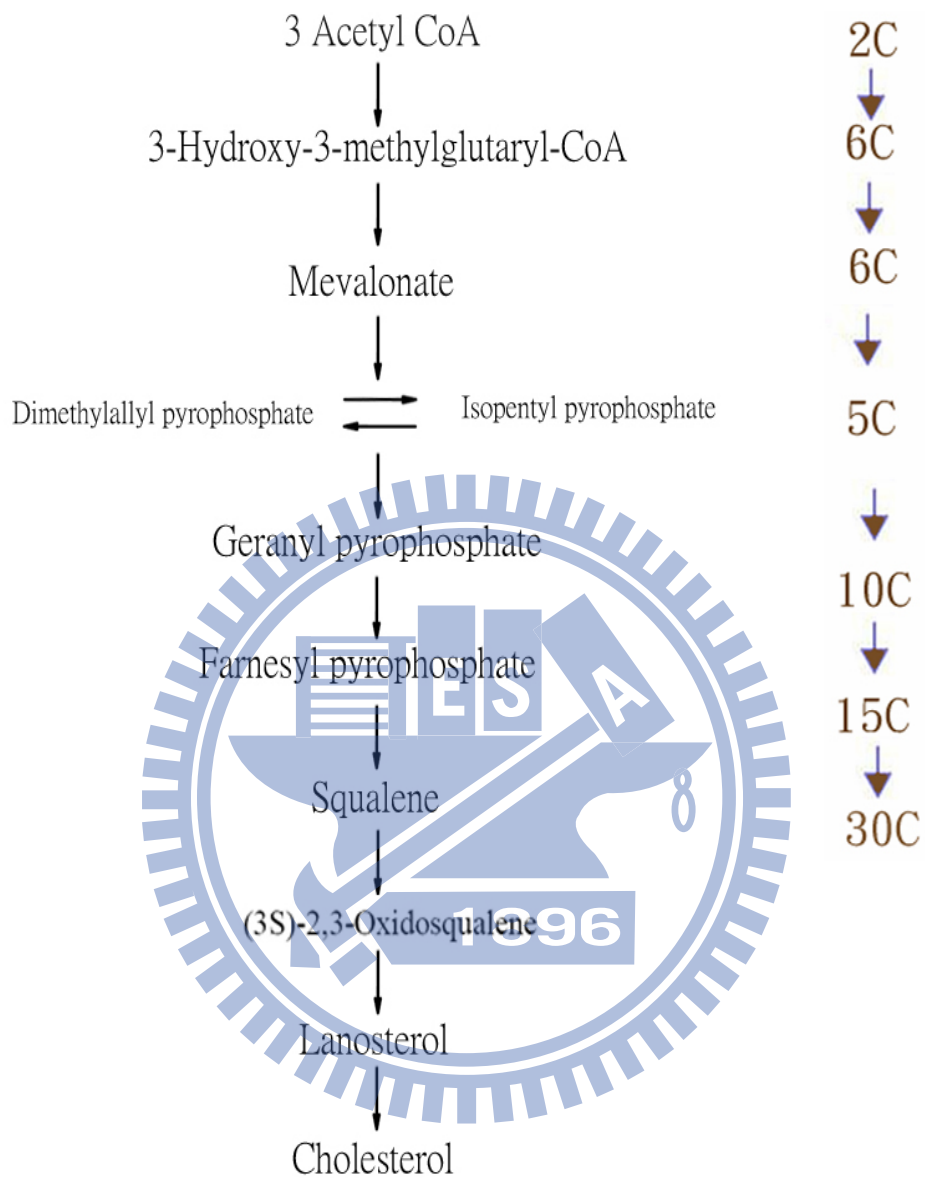
### 1.1.2 膽固醇的生合成途徑

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<sup>14</sup>。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，主要是著重於以HMG-CoA Reductase做為抑制劑的研究對象，也就是Statins，例如說：Atorvastatin、Fluvastatin、Lovastatin、Pravastatin、Rosuvastatin、Simvastatin都是這類的藥物，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。由於固醇類合成代謝途徑中的環化酵素—氧化鯊烯環化酵素(Oxidosqualene Cyclase; OSC)位於整個反應的中下游《圖1-2》，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<sup>15</sup>。

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。



《圖1-2》膽固醇的生合成途徑

## 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<sup>16</sup>。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，而生成了如此多樣的產物，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 ((3*S*)-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的生物轉化反應之一。

三萜類在不同物種間依其之酵素，能分別將直鏈狀多烯類的鯊烯或氧化鯊烯，經由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<sup>17</sup>。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 $\alpha$ -香桂素 ( $\alpha$ -Amyrin) 或  $\beta$ -香桂素 ( $\beta$ -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<sup>16</sup> 《圖1-3》 《圖1-4》。



### 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<sup>18</sup>。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<sup>19</sup>。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<sup>20</sup>。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<sup>21,22</sup>。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<sup>23</sup>。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<sup>23</sup>。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<sup>24,25</sup>。

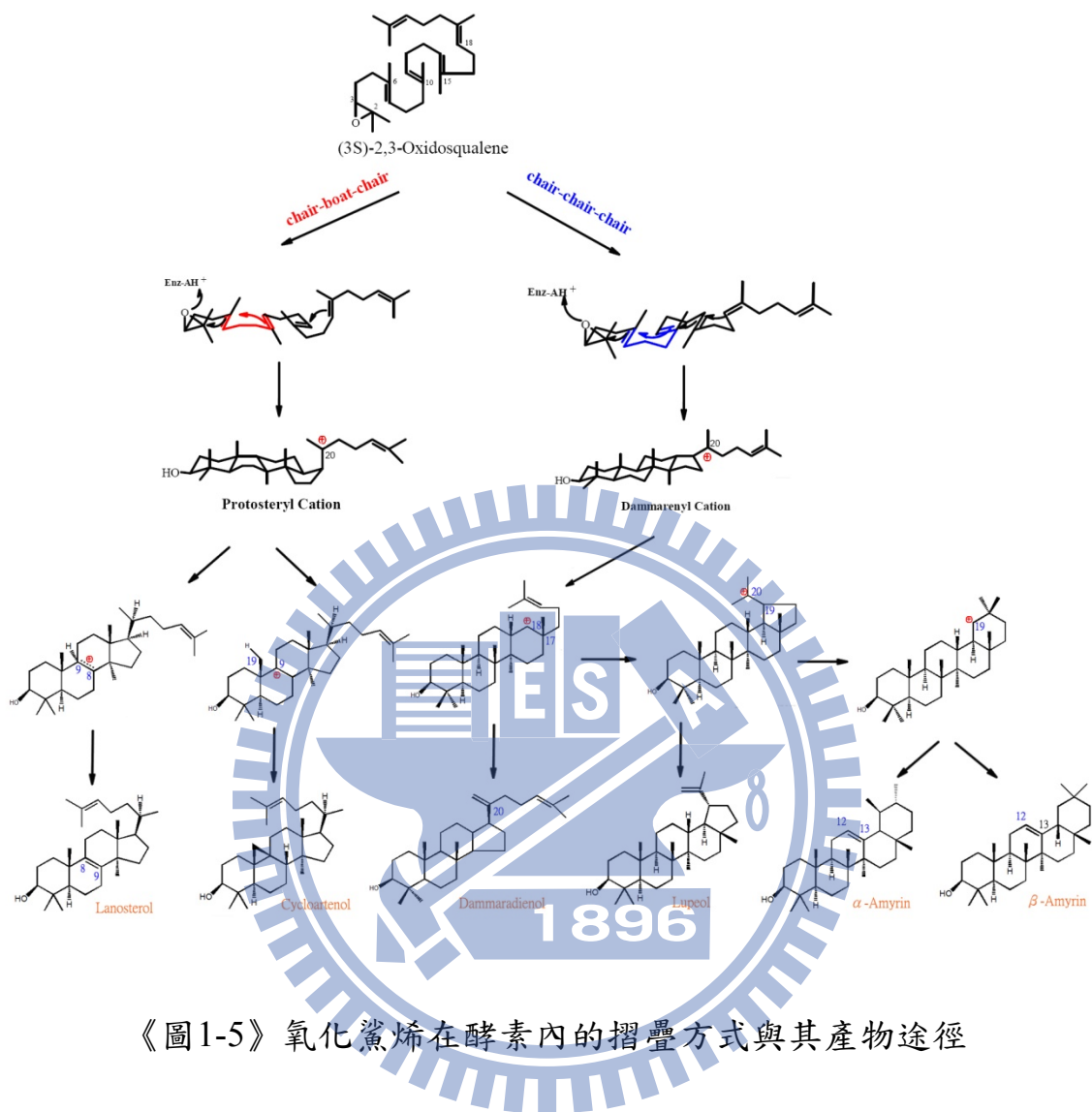
在先前的研究中指出，若將鯊烯置於中性或是弱酸的溶液中，在室溫下可穩定地存放一天，因此強酸被認為是在開環的起始反應中所必需的<sup>24</sup>。而突變實驗也證明了胺基酸Asp在氧化鯊烯環化酵素家族中具有高度保留性並且為催化所必須之胺基酸<sup>3</sup>。因此，Asp被認為是誘導環氧基開環的重要基團，可以提供質子進行開環。在環化反應方面，受質經由受質通道進入酵素以後酵素上的胺基酸基團電子會誘導受質摺疊成適當結構，再經由酵素上酸性基團Asp誘導開環，過程中會形成許多具有高能量的碳陽離子中間產物，進而進行環化與骨架重排等反應。最後再經由酵素胺基酸與受質間的牽引交換，或是藉由水分子的作用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<sup>26,27</sup>，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後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，進而形成多樣的產物。

細部來說，整個環化過程中包含了非常多個鍵的斷裂與生成，從一開始的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，接下來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<sup>3</sup>。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 cation

intermediates)。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，接著再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、 $\alpha$ -香桂素及 $\beta$ -香桂素等<sup>28-30</sup>《圖1-5》。





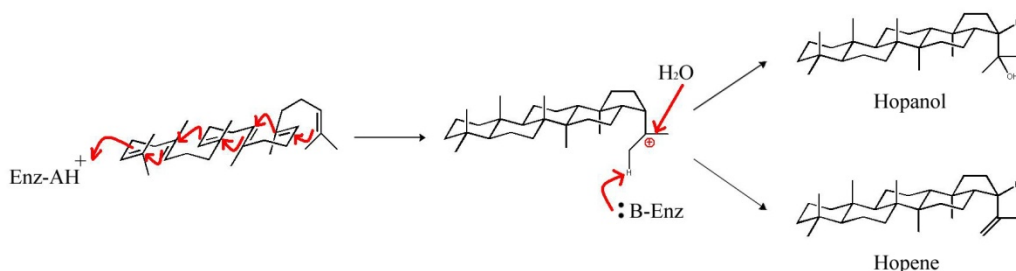
《圖1-5》氧化鯊烯在酵素內的摺疊方式與其產物途徑

## 1.4 各物種間多樣性三萜類產物反應機構

接下來就對於鯊烯-蛇麻烯環化酵素（Squalene - Hopene Cyclase；SHC）以及各種不同物種氧化鯊烯環化酵素的研究作介紹

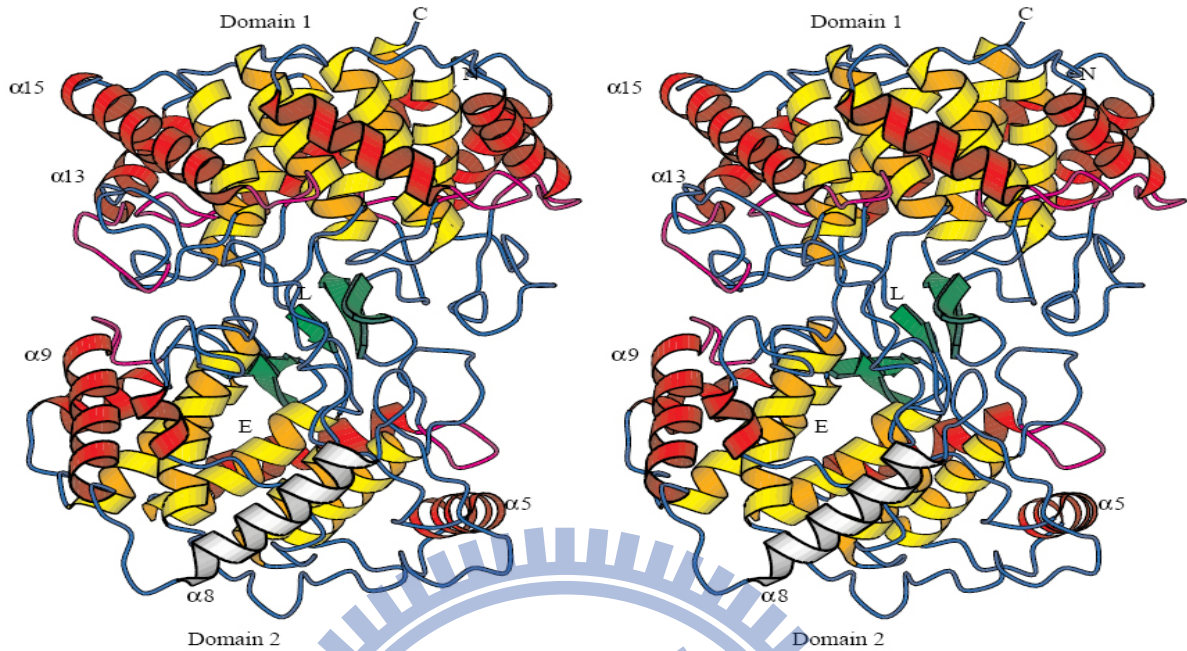
### 1.4.1 鯊烯-蛇麻烯環化酵素 (SHC)

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1-6》。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1-6》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<sup>31</sup>。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 $\alpha$ 螺旋 ( $\alpha$ -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1-7》。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。

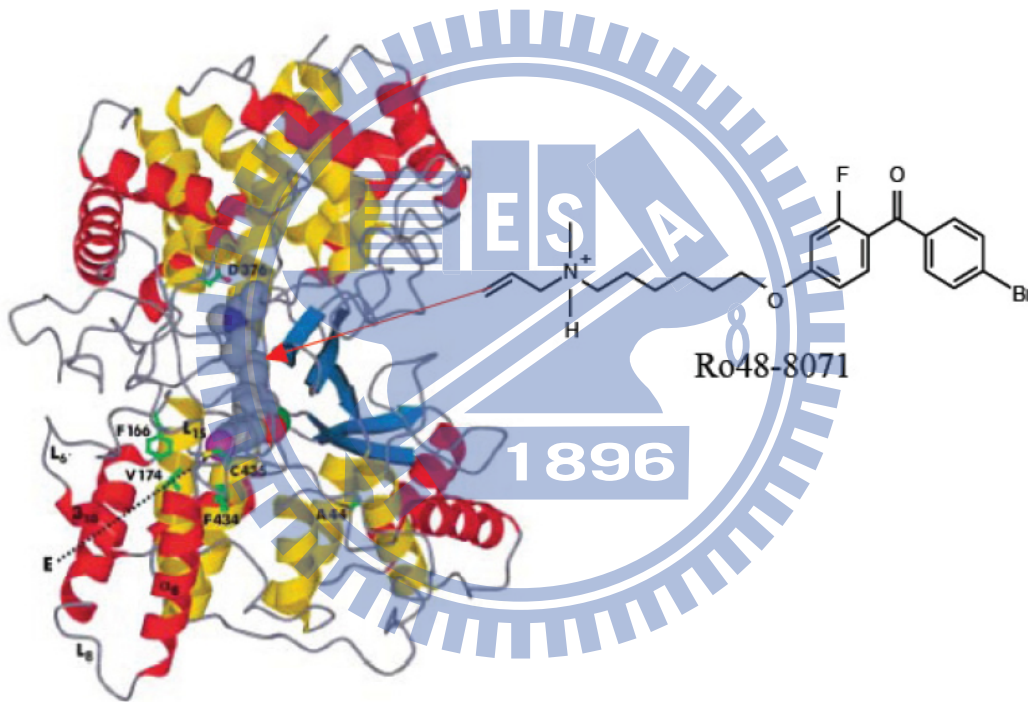


《圖1-7》SHC之X-射線晶體結構圖。C：胺基酸的COOH端；N：NH<sub>2</sub>端；L：抑制劑（LDIAO）接合位置；E：酵素表面唯一的非極性區域，約為1600Å<sup>2</sup>並被認為是受質進入的通道（Entrance Channel）。紅色與黃色緞帶構形為 $\alpha$ -Helix的結構；綠色為 $\beta$ 結構；紫色為QW-Motifs 之重複區域。

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<sup>15</sup>。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

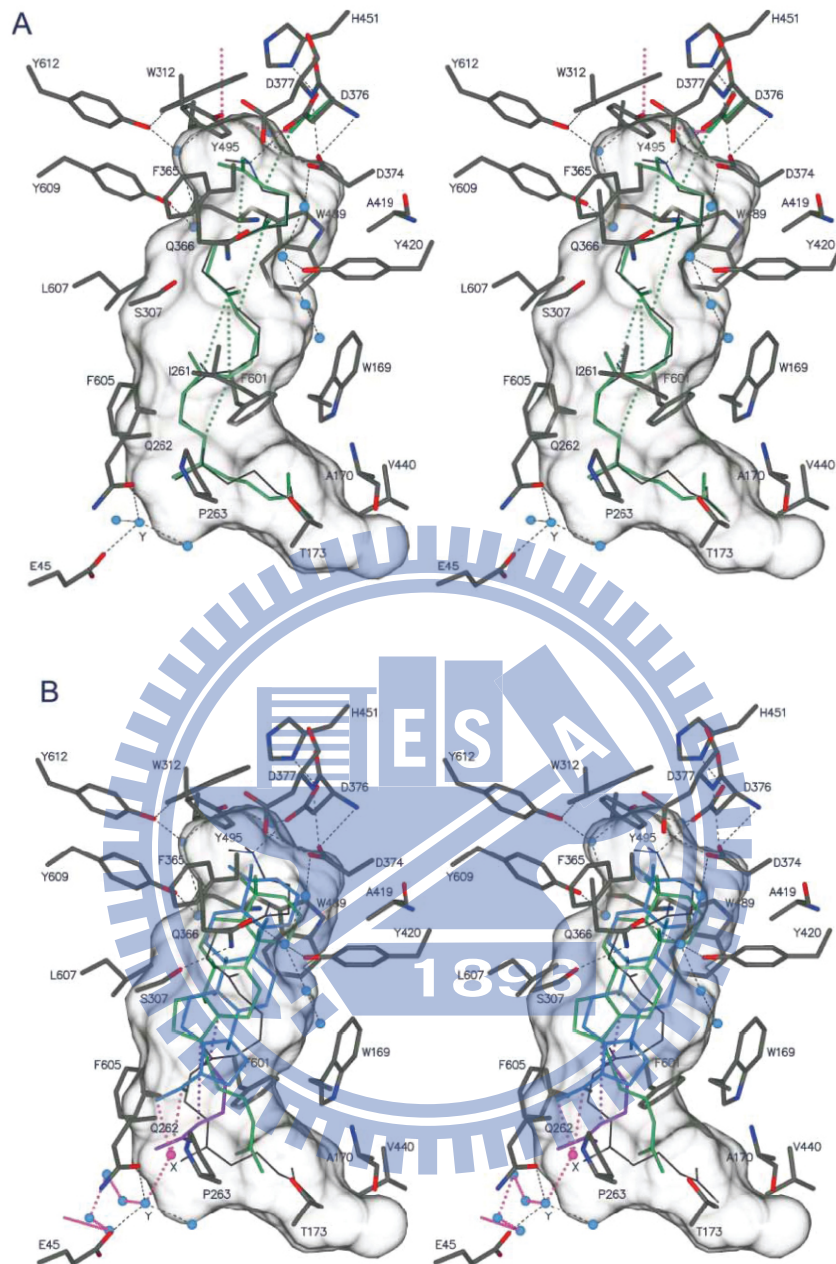
雙鍵打開質子化的角色，並且會與His451間產生氫鍵作用，另外若加上 Tyr495和Asp376與水分子的互相聯繫，增強Asp376所扮演的路易斯酸來協助起始環化反應的角色《圖1-8》。

此外，在2004年Schluz等人利用2-azasqualene當作抑制劑來研究*A. acidocaldarius* SHC，更從其中推斷可能的活性區域<sup>32</sup>《圖1-9》



《圖1-8》藉由抑制劑 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<sup>15</sup>

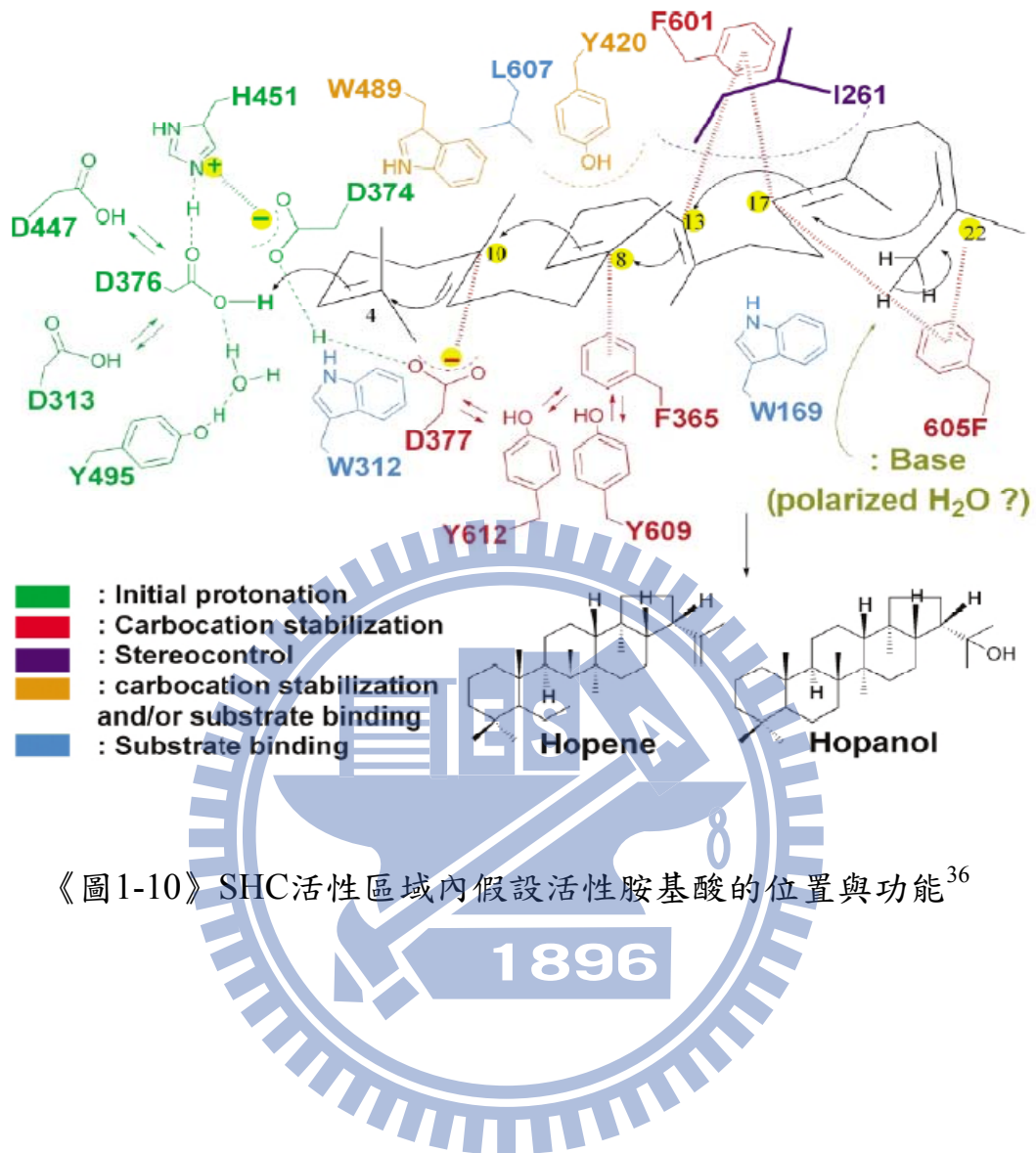




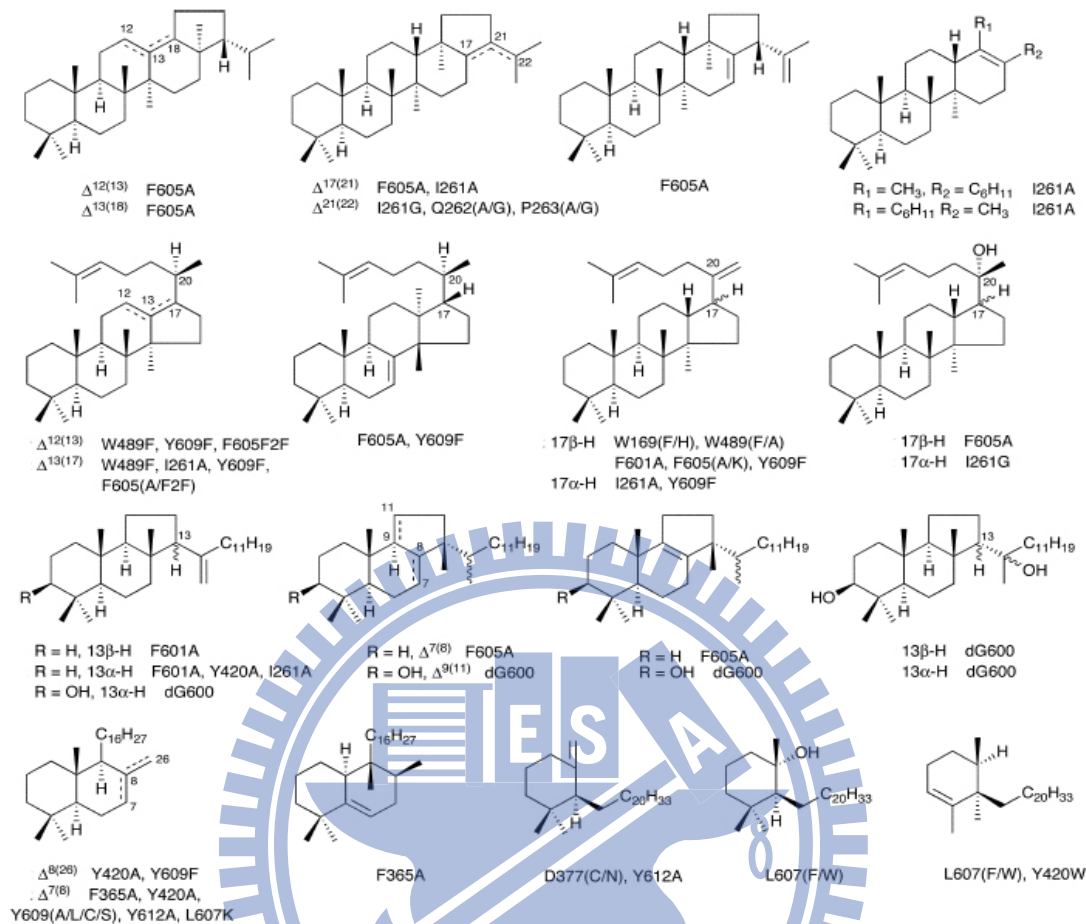
《圖1-9》利用X-ray推斷SHC可能的活性區域<sup>32</sup>

綜合SHC的結晶結構與定點突變的實驗結果<sup>33</sup>，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<sup>33</sup>。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- $\pi$ 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1-10》<sup>34,35</sup>。同樣地，Trp489也被認為會利用其碳陽離子- $\pi$ 電子的交互作用穩定A環的形成<sup>36</sup>。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<sup>37</sup>。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<sup>35</sup>。根據上面的推論也進行了一系列的定點飽和突變的研究<sup>33</sup>，而結果如《圖1-11》



《圖1-10》SHC活性區域內假設活性胺基酸的位置與功能<sup>36</sup>



《圖1-11》SHC各突變點產物分布圖<sup>33</sup>

## 1.4.2 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 scerevisiae*) 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：

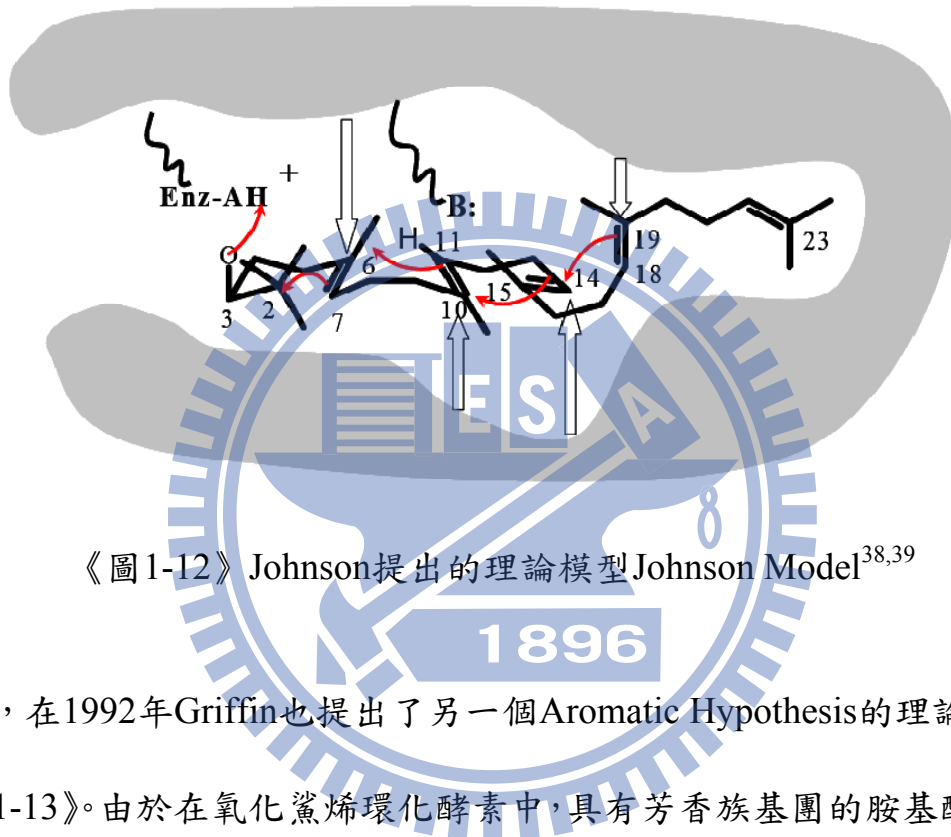
- (1) 利用氧化鯊烯的類似物來取代受質進行環化機制的研究。
- (2) 比對不同物種之羊毛硬脂醇環化酵素之蛋白質序列與基因選殖，從得到的序列資訊進行結構與機制上的探討。
- (3) 以定點突變的方式來研究酵素上某些胺基酸基團在環化機制上所扮演的角色。

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。

#### 1.4.2.1 氧化鯊烯環化酵素受質穩定之假說

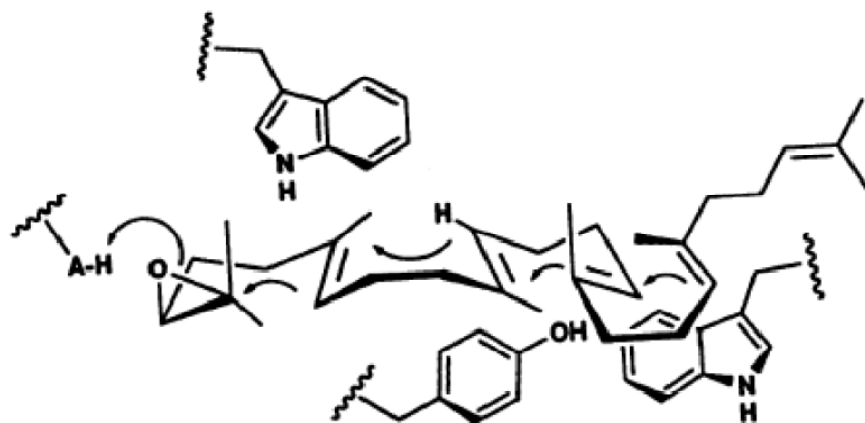
針對OSC的受質專一性和反應的立體化學等特性，有兩種假說被提出來，用以說明酵素是如何穩定這些具有高能量的碳陽離子中間產物。1987年，Johnson提出了第一個理論模型（Johnson Model）《圖1-12》，

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<sup>38,39</sup>。



《圖1-12》Johnson提出的理論模型Johnson Model<sup>38,39</sup>

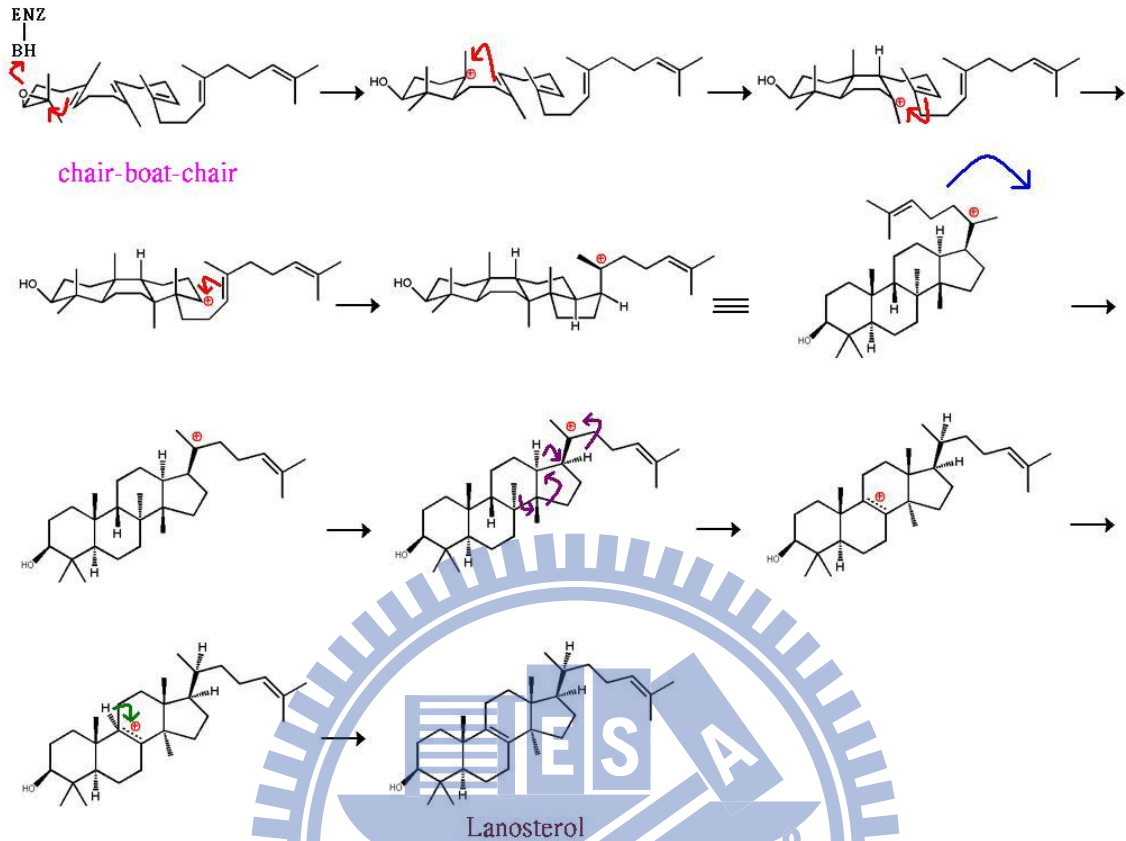
另外，在1992年Griffin也提出了另一個Aromatic Hypothesis的理論模組<sup>40</sup>《圖1-13》。由於在氧化鯊烯環化酵素中，具有芳香族基團的胺基酸Tyr、Trp與Phe在各物種中皆具有高度保留性，因此Griffin認為這些基團會利用碳陽離子- $\pi$ 電子作用（cation- $\pi$  interaction）的穩定效應，來引導受質進行適當的骨架摺疊並且穩定具有高能量且帶正電的中間產物，使其之後的甲基與氫化基可以做適當的轉移重排。



《圖1-13》Griffin所提出的Aromatic Hypothesis理論模組<sup>40</sup>

#### 1.4.2.2 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(3S)-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脂醇《圖1-14》。



《圖1-14》OSC催化氧化鯊烯形成羊毛硬脂醇的環化機制

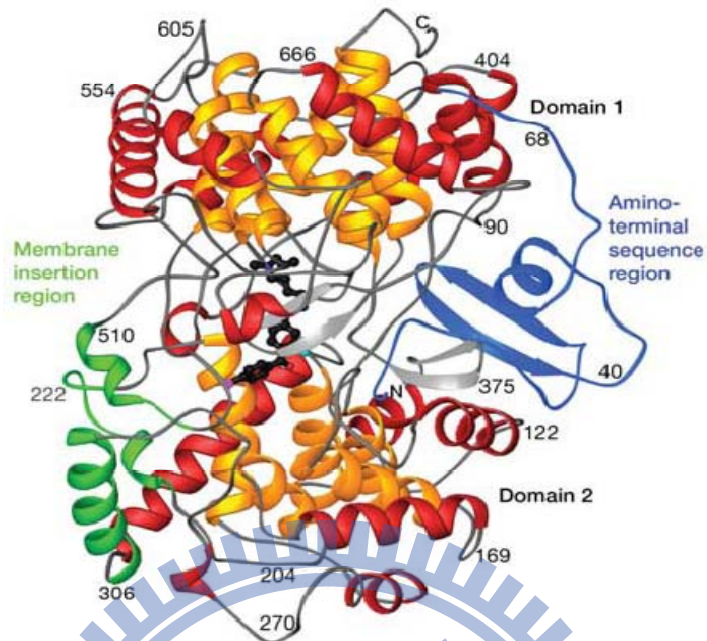
### 1.4.2.3 人類氧化鯊烯-羊毛硬脂醇環化酵素（OSC）

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<sup>41</sup>。由於OSC結構的確定《圖1-15》，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。

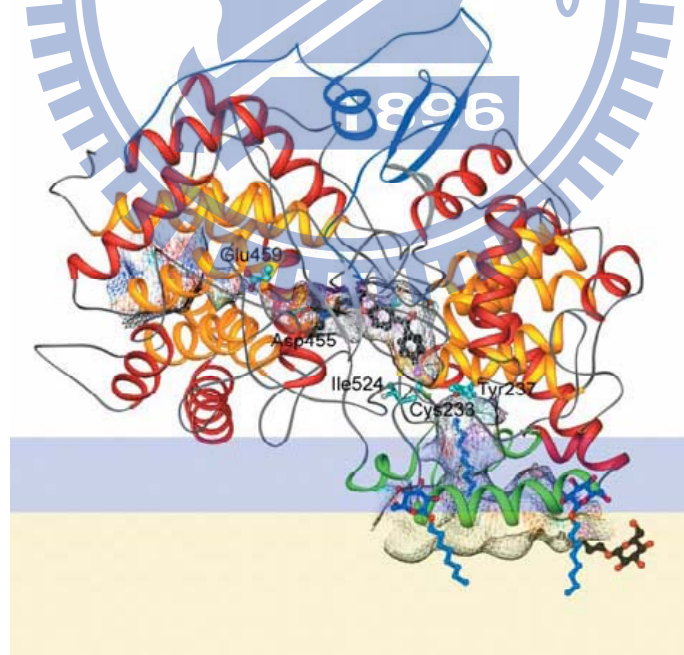


由人類OSC的結晶結構中可以得知，此酵素位於膜的部分有一個直徑約25Å的通道，此通道被認為是受質氧化鯊烯進入疏水性活性區域的入口，並且會對活性區域具有分隔的作用。此受質通道會藉由其環狀區域胺基酸516~524區域與697~699區域的重排作用，或是藉由Tyr237、Cys233及Ile524等胺基酸其側鏈構形的改變來形成《圖1-16》。





《圖1-15》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<sup>41</sup>

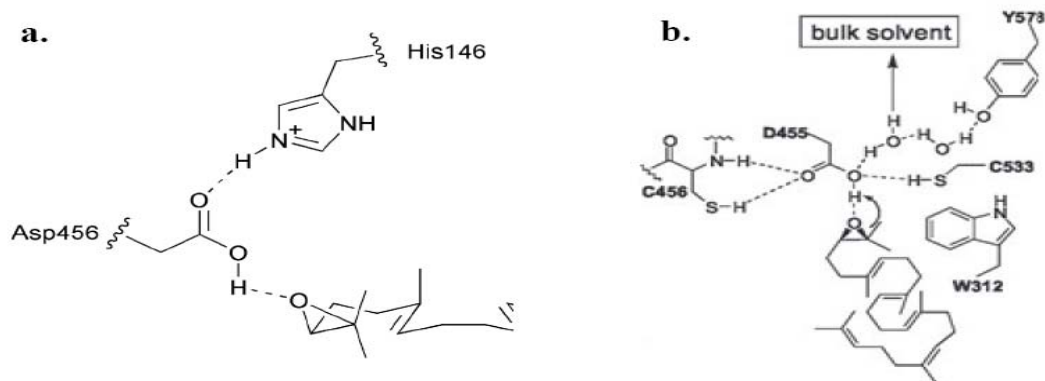


《圖1-16》人類OSC與膜結合時的構形，圖中黑色為抑制劑Ro48-8071結合在中心反應的活性結合區<sup>41</sup>

#### 1.4.2.4 氧化鯊烯-羊毛硬脂醇環化酵素OSC各反應步驟探討

##### (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<sup>42</sup>。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<sup>25,43</sup>。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1-17a》<sup>44</sup>。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1-17b》<sup>45,46</sup>。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<sup>47-51</sup>。



《圖1-17》 a. 酵母菌OSC假設開環環化機制<sup>43</sup>

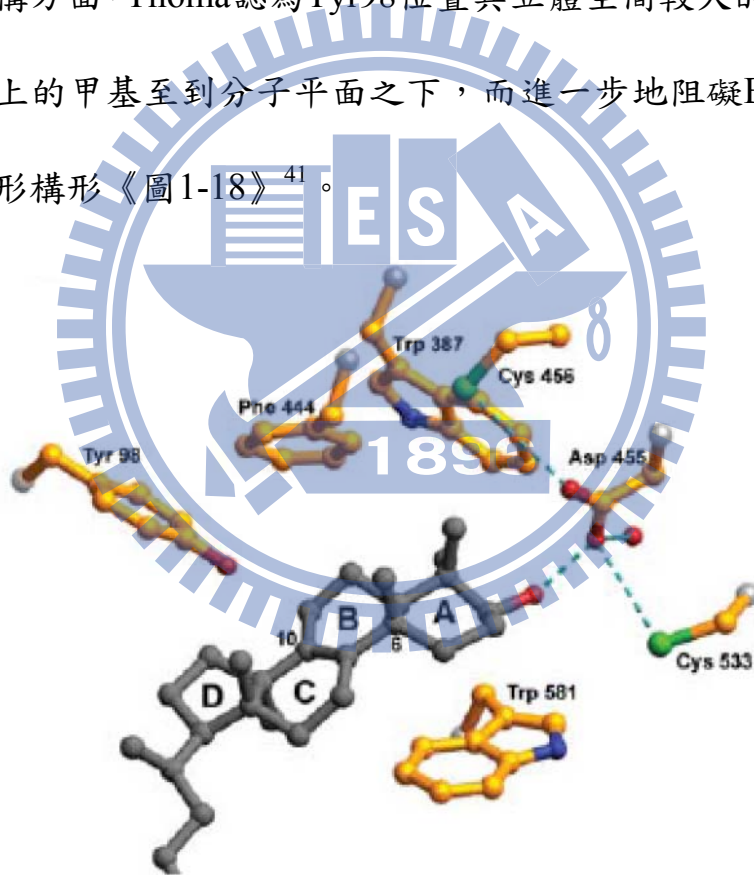
b. 人類OSC開環環化機制<sup>45,46</sup>

## (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<sup>52</sup>。

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- $\pi$ 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<sup>53</sup>。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1-18》<sup>41</sup>。



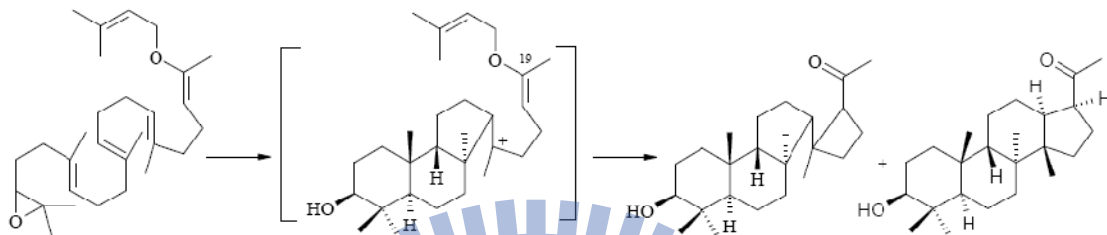
《圖1-18》 Trp387、Phe444、Trp581穩定A環與B環形成時的C6、C10-碳陽離子中間物；Tyr98的側鏈藉由立體空間障礙促使B環形成能量較不傾向的船形結構<sup>41</sup>

在酵母菌ERG7胺基酸Trp390位置的飽和定點突變實驗結果中，果真發現了單環的Achilleol A以及Camelliol C，這也證實了人類OSC中Trp387是來穩定A環形成時的C6碳陽離子中間物；而在酵母菌ERG7胺基酸Trp587位置的飽和定點突變實驗結果中，則有所不同，在產物分析後得到除了相同芳香族的胺基酸之外其餘皆沒有產物的產生，證明了這個點是利用芳香族的胺基酸上的 $\pi$ 電子雲來進行受質的辨認<sup>54</sup>

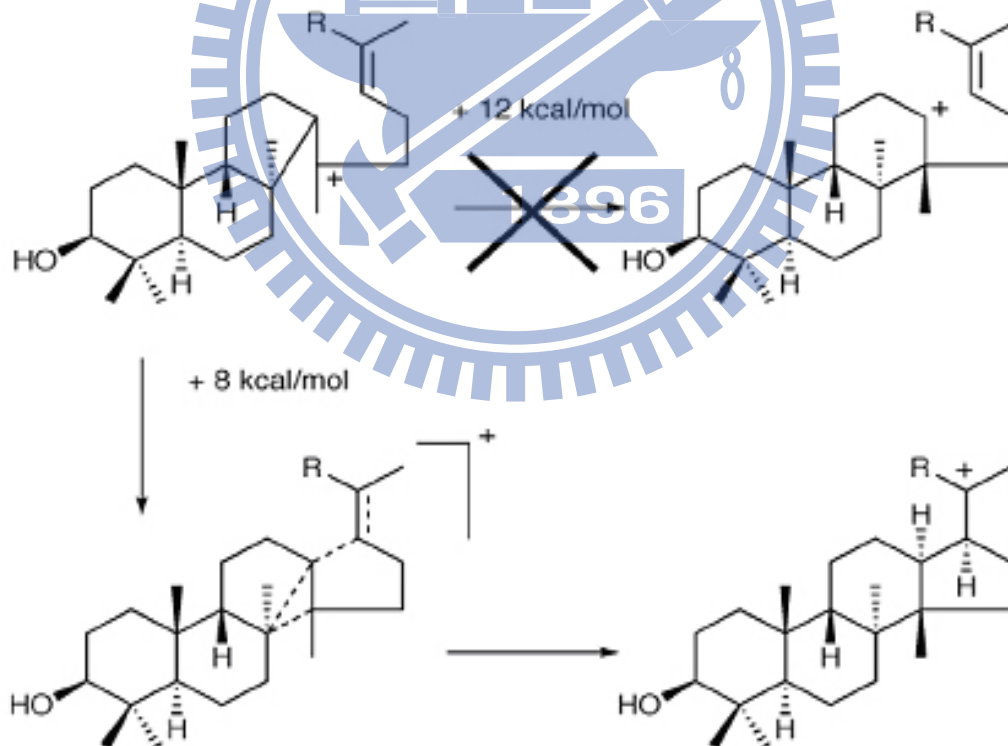
不過在酵母菌ERG7胺基酸Tyr99位置的飽和定點突變實驗結果中，Tyr99已被證實是與C-14碳陽離子的穩定有關，在此位置進行突變則會得到665三環的產物(13 $\alpha$ H)-isomalabarica-14E,17E,21-trien-3 $\beta$ -ol、(13 $\alpha$ H)-isomalabarica-14Z,17E,21-trien-3 $\beta$ -ol與羊毛硬脂醇等產物<sup>55</sup>。

1995年，Corey等人在以20-oxaaxidosqualene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1-19》<sup>56,57</sup>。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<sup>48</sup>；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之後同時發生，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1-20》<sup>58,59</sup>。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<sup>60</sup>。



《圖1-19》利用類似物作為受質結果顯示C環會先形成五圓環



《圖1-20》Hess認為C環與D環會經由過渡態之後同時形成<sup>61</sup>

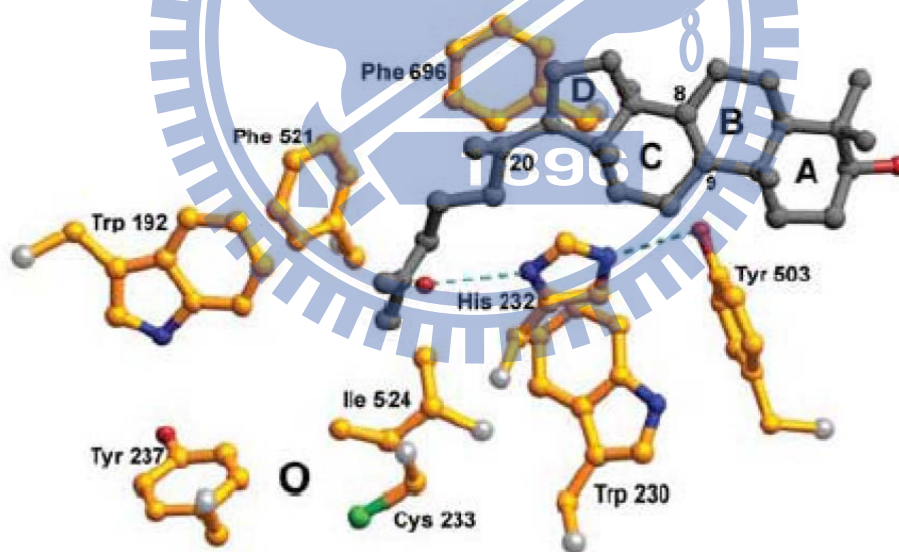
在人類OSC的結晶結構中，His232與Phe696被認為它們可以藉由其胺基酸側鏈上所富含 $\pi$ 電子的特性，來穩定形成C環時依反-馬可尼可夫（anti-Markovnikov）法則產生二級碳陽離子，並且可以利用碳陽離子- $\pi$ 共振作用來穩定帶有正電荷的高能C-20碳陽離子中間物。然而在酵母菌ERG7胺基酸His234位置的定點突變實驗中，也發現了(13*RH*)-isomalabarica-14(26),17*E*,21-trien-3 $\beta$ -ol的三環產物<sup>62</sup>；在酵母菌ERG7胺基酸Phe699位置的定點突變實驗中，除了發現三環的相關產物以外，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<sup>63</sup>。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 $\pi$ 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

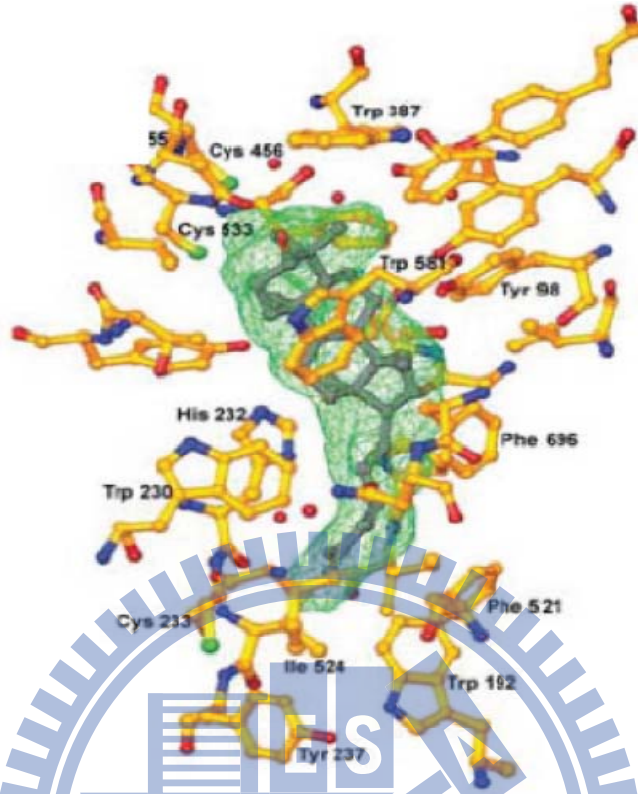
在環化反應結束之後，酵素會藉由其活性內許多具有高度 $\pi$ 電子性質的芳香族基團之胺基酸（如Trp192、Trp230、His232、Tyr237、Tyr503、Phe521與Phe696等），透過碳陽離子- $\pi$ 電子的共振作用來穩定甲基與氫



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1-21》<sup>3,41</sup>。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1-22》<sup>41</sup>。



《圖1-21》具有高度保留性的芳香族性胺基酸Trp192、Trp230、His232、  
Tyr237、Tyr503、Phe521與Phe696可以利用碳陽離子與 $\pi$ 電子共振交互  
作用去穩定甲基與氫化基的骨架重排<sup>41</sup>。

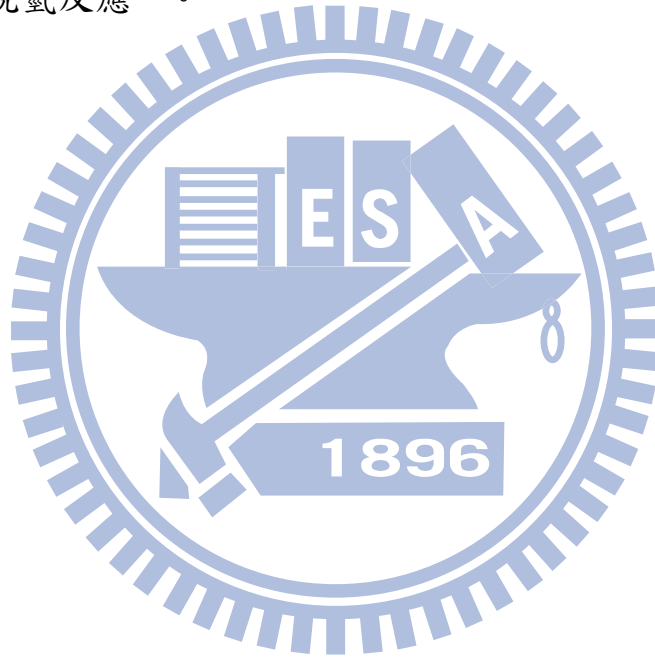


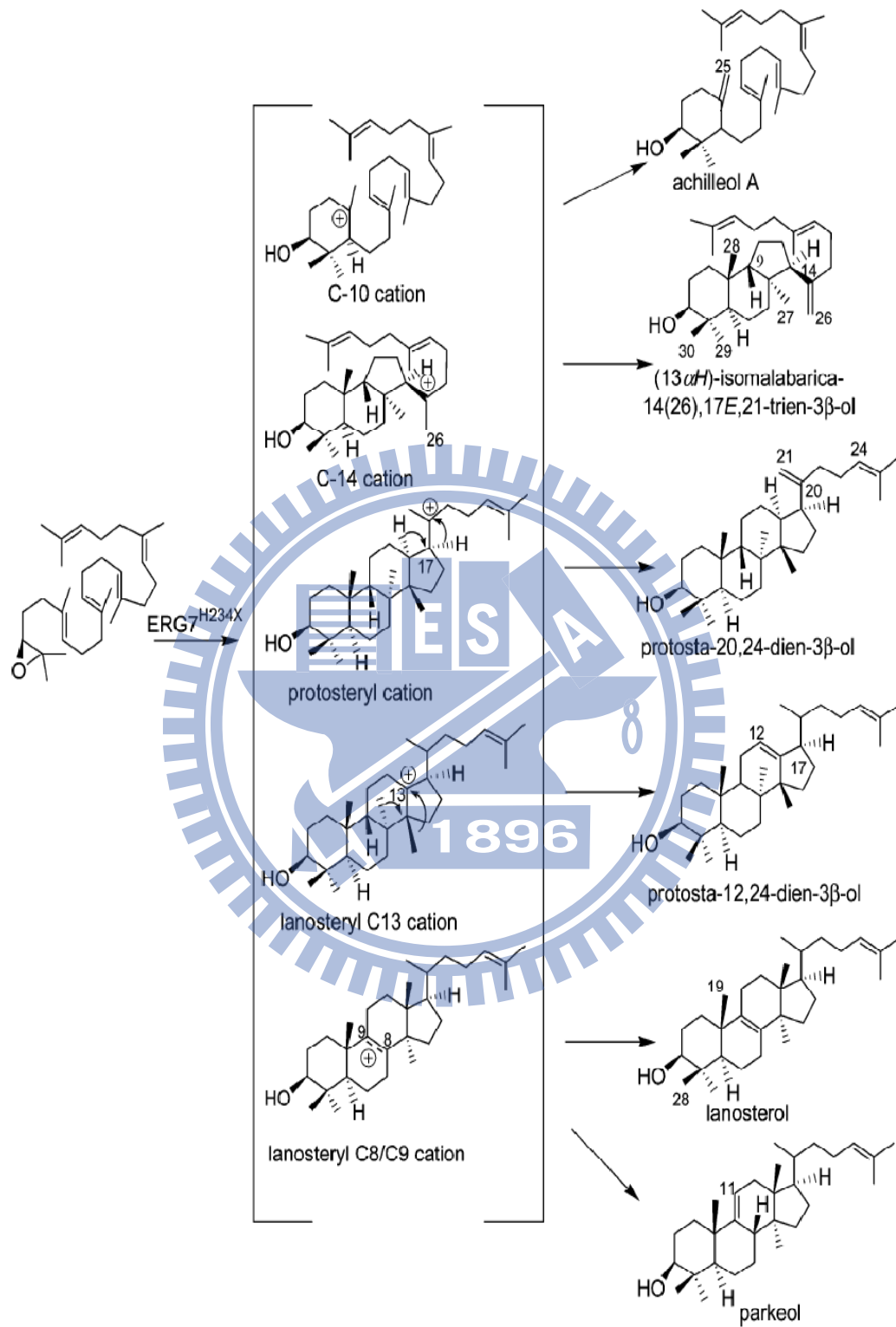
《圖1-22》氧化鯊烯環化酵素與其產物-羊毛硬脂醇形成複合物的結構圖。

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<sup>41</sup>。

除了人類 OSC 的結晶結構外，His234、Trp232 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 $\beta$ -ol、protosta-12,24-diene-3 $\beta$ -ol 還有 parkeol<sup>62,64</sup> 《圖 1-23》，而 Trp232 也在在不同地方進行脫氫反應的四環產物產生 protosta-12,24-diene-3 $\beta$ -ol 還有

parkeol，這證明這兩個胺基酸在重排以及脫氫反應上佔有重要的一席之地，不同的是 Trp232 並未涉及影響環化的反應的進行。另外，在 Tyr510 突變成 Ala 的突變點中也發現了 parkeol<sup>65,66</sup>。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- $\pi$  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<sup>67</sup>。





《圖1-23》H234定點飽和突變的產物<sup>62</sup>

### 1.4.3 氧化鯊烯-環阿屯醇環化酵素 (CAS)

在高等植物的脂醇生合成途徑中，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



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1-24》。根據研究結果顯示，Ile481會藉由其 $\gamma$ 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1-25、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<sup>69</sup>。而在*AthCAS1*<sup>Tyr410Thr</sup>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 $\beta$ -lanosta-7, 24-dien-3 $\beta$ -ol以及1% achilleol A《圖1-25、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 $\alpha$ -碳，因此在*AthCAS1*<sup>Tyr410Thr</sup>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 $\beta$ -lanosta-7,24-dien-3 $\beta$ -ol<sup>71</sup>。

CAS<sup>His477</sup>雖不位於受質鍵結的活性區域，但是曾有報導指出，位於活化區外圍（second-sphere）的His477會與Tyr410產生氫鍵的交互作用

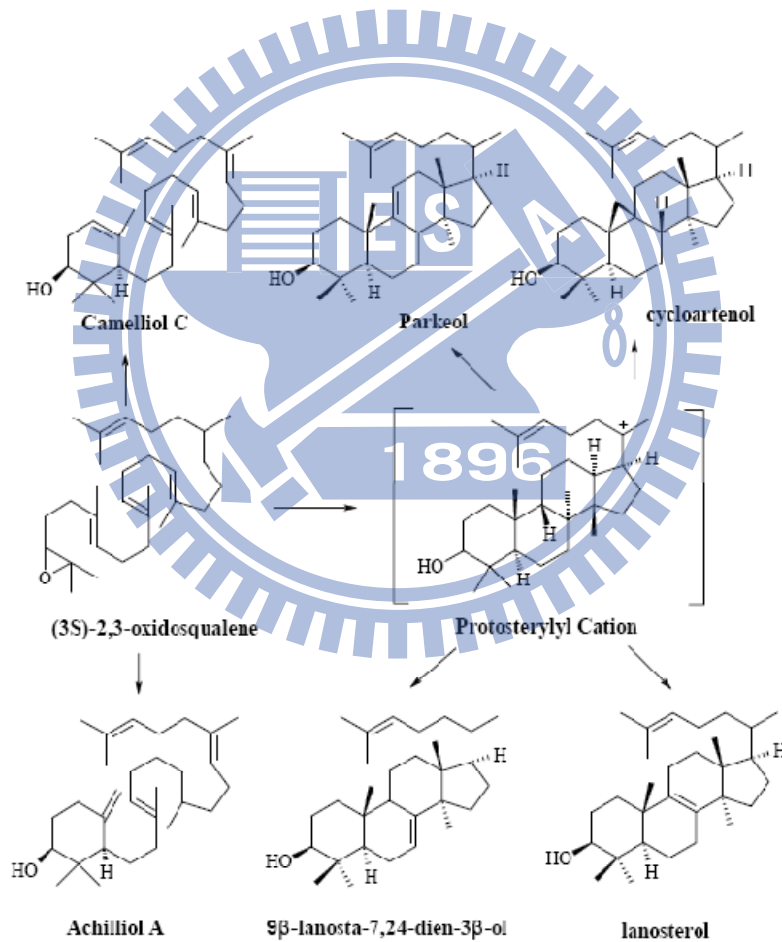
而互相拉扯，進而影響環化機制的最終脫氫反應<sup>69</sup>。His477在所有物種的CAS中皆具有高度保留性，而在ERG7中則會以Gln或Cys取而代之。在*AthCAS1*<sup>His477Gln</sup>的突變株中，帶有極性的官能基會向C-11移動靠近，造成在C-11位置行脫氫反應而產生parkeol多於羊毛硬脂醇的結果；而在*AthCAS1*<sup>His477Asn</sup>的突變株中，則會產生大量的羊毛硬脂醇，但由於其胺基酸基團也夠靠近C-11的位置，所以也會產生Parkeol<sup>72</sup>。

在整個CAS環化過程中，His257與Asp483被認為是CAS催化活性上所必需。Asp483被認為會作為一個路易斯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<sup>44</sup>。另外在雙定點突變株*AthCAS1*<sup>I481V/Y410T</sup>中，發現其產生羊毛硬脂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脂醇的生成。而經實驗的結果證實，產生羊毛硬脂醇效率最好的突變株為雙定點突變株*AthCAS1*<sup>H477N/I481V</sup>《表1-1》<sup>72</sup>。

整合上述在植物CAS中的定點突變可以發現，在*AthCAS1*<sup>H477N</sup>與*AthCAS1*<sup>I481V</sup>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1-25》阿拉伯芥CAS定點突變產物結構圖<sup>68</sup>

<i>Ath</i> CAS1 mutants	Cycloartenol	Lanosterol	Parkeol	9 $\beta$ - $\Delta$ 7-Lanosterol	Achilleol A	Camelliol C
CAS1 <sup>I481</sup>	99	-	1	-	-	-
CAS1 <sup>I481L</sup>	83	1	16	-	-	-
CAS1 <sup>I481V</sup>	55	24	21	-	-	-
CAS1 <sup>I481A</sup>	12	54	15	-	13	6
CAS1 <sup>I481G</sup>	17	23	4	-	44	12
CAS1 <sup>Y410T</sup>	-	65	2	33	-	-
CAS1 <sup>Y410C</sup>	-	75	-	24	1	-
CAS1 <sup>H477N</sup>	-	88	12	-	-	-
CAS1 <sup>H477Q</sup>	-	22	73	5	-	-
CAS1 <sup>I481V/Y410T</sup>	-	78	< 1	22	-	-
CAS1 <sup>I481V/H477N/Y410T</sup>	-	78	-	22	-	-
CAS1 <sup>I481V/H477Q/Y410T</sup>	-	78	-	22	-	-
CAS1 <sup>I481V/H477N</sup>	-	99	1	-	-	-
CAS1 <sup>I481V/H477Q</sup>	-	94	6	-	-	-

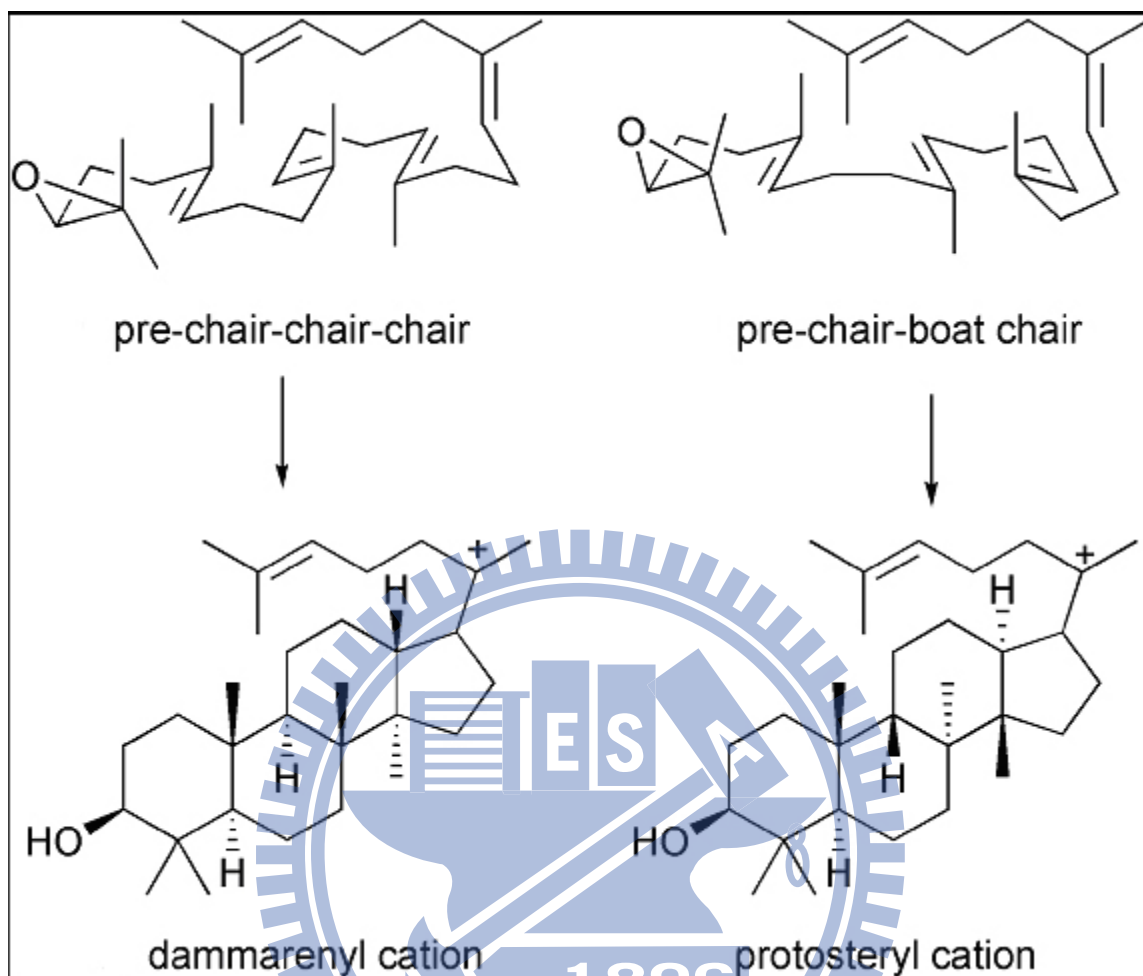
《表 1-1》阿拉伯芥 CAS 定點突變產物及比例分配表<sup>68</sup>

#### 1.4.4 氧化鯊烯-羽扇醇合成酵素與 $\beta$ -香桂素合成酵素 (LUP & BAS)

天然物中包含了數千種的三萜類的產物，而這些產物大部分來自於氧化鯊烯環化酵素這個家族，而這些酵素會催化氧化鯊烯而形成達瑪烯碳陽離子中間物 (Dammarenyl Cation intermediates) 以及原脂醇碳陽離子中間物 (Protosteryl Cation intermediates)，他們分別有不同的立體構形；而這是從何而來的呢？主要是羊毛硬脂醇環化酵素以及環阿屯醇環化酵素會將氧化鯊烯折疊成椅形-船形-椅形 (chair-boat-chair)，進而環

化形成原脂醇碳陽離子，而不同於這兩種酵素的羽扇醇合成酵素(Lupeol Synthase；LUS) 以及  $\beta$ -香桂素合成酵素會將氧化鯊烯折疊成椅形-椅形-椅形 (chair-chair-chair) 《圖 1-26》，進而環化形成達瑪烯碳陽離子中間物。

這兩種不同的類型影響著如何進行定點突變的實驗，原脂醇碳陽離子之後形成的產物是固醇類的前驅物，固醇類很早就自然界的真核生物中產生所以這類會產生原脂醇碳陽離子的酵素在真核生物中分佈的十分的廣泛，由於很早就自然中產生，所以也經過了很長的演化過程，在這長久的演化過程之中在兩個不同的羊毛硬脂醇環化酵素之間序列比對的相同性可以達到非常的低,例如說：trypanosomal 和哺乳類動物間羊毛硬脂醇環化酵素序列比對相似度只有 30-35%；在研究上的策略專注於由於這些序列上高度保留性的胺基酸，研究人員可以利用定點飽和突變方式來研究它們個別的功能



《圖1-26》 酵素催化氧化鯊烯而形成達瑪烯碳陽離子中間物以及原脂醇  
碳陽離子中間物

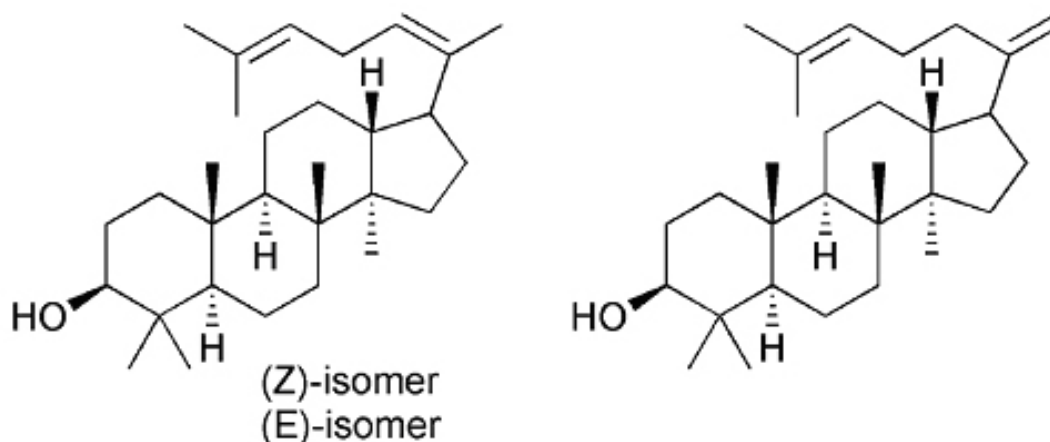
羽扇醇合成酵素 (Lupeol Synthase ; LUS) 以及  $\beta$ -香桂素合成酵素，會將氧化鯊烯折疊成椅形-椅形-椅形 (chair-chair-chair)，進而環化形成達瑪烯碳陽離子中間物的酵素，它們彼此之間的基因序列比對相似度高達 80%，在比對羽扇醇合成酵素(OEW)和  $\beta$ -香桂素合成酵素(PNY)這兩種基因的差異性發現，在組成酵素的七百多個胺基酸中，彼此間的差異

只有 80 個胺基酸，這是因為這兩種酵素都是在雙子葉植物上面所產生的，而雙子葉植物這種高等的植物是近代才有的，演化時間自然沒有很長久，所以他們序列上的相似度自然而然十分高；但是，序列比對相似度高，而其中間產物達瑪烯碳陽離子也相同，卻產生兩種的最終產物，這使得研究策略上面專注於彼此之間不同的胺基酸殘基而不是有高度保留性的胺基酸殘基，要研究其功能性，也是使用定點飽和突變方式，嘗試突變成相對的胺基酸，觀察最後所產生的產物，探討其功能。

根據這種想法 Ebizuka 團隊對於 OEW 和 PNY 彼此間這 80 個不同的胺基酸進行定點突變的研究，先進行酵素構形的模擬，找出可能為活性區域的胺基酸，接下來使用定點突變的方式觀察其產物的差異；發現了 OEW 中的 Leu256 對應於 PNY 中的 Trp259 為這兩個酵素產物特異性的調控胺基酸<sup>73</sup>。

因此研究人員將原本產生羽扇醇的 OEW 中 Leu256 突變成 PNY 相對應的 Trp 結果產生了高達 75% 的  $\beta$ -香桂素，而將原本產生  $\beta$ -香桂素的 PNY 中

Trp259 突變成相對應的 Leu，所產生的羽扇醇為  $\beta$ -香桂素的兩倍之多，藉此確定這個位置的胺基酸為羽扇醇合成酵素和  $\beta$ -香桂素合成酵素的產物特異性調控胺基酸。此外還將 PNY 中的 Tyr261 突變成 OSC 相對應的 His，結果產生了三種的產物《圖 1-27》。



《圖1-27》飽合定點突變實驗中PNY的Tyr261H所產生的三種產物

## 1.5 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，各個物種間擁有高度保留性的胺基酸以及其中差異的胺基酸，而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- $\pi$ 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<sup>38</sup>。

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1-28》則列出環化酵素家族的蛋白質序列比對，其中包含：*P.sativum*的BAS、*O.Europa*的LUP、阿拉伯芥(*A. Thaliana*)之CAS、阿拉伯芥(*A.Thaliana*)LAS、人類(*H.sapiens*)之OSC以及酵母菌(*S.cerevisiae*)之OSC《圖1-28》。

Ps_BAS	MWRLKIAEGGNDPYLFSTNNFVGRQTWEYDPEAGSBEERAQVEEARRNFYNNRFEVKPCG	60
Oe_LUP	MWKLKIADG-TGPWLTTTNNHIGRQHWFEFDPEAGTPDERVEVERLREEFKKNRFRTKQSA	59
At_CAS	MWKLKIAEG-GSPWLRRTNNHVGRQFWEFDPNLGTPEDLAAVEEARKSFPDNRVQKHSA	59
At_LAS	MWRLKLESEG-DE---ESVNQHVGVRQFWEYDNOFGTSEERHHI NHLRSNFTLNRFSSKHSS	56
Hs_OSC	-----MTEG-----TCLRRRGGPYKTEPATDLGRWRLNCERGRQTWTYLQDERAG	45
Sc_OSC	-----MTEF-----YSDTIG-----LPKTDPRWLRLRTDELGRESWEYLTPQQAAN	41
	::: : : . : :	
Ps_BAS	DLLWRFQVLREN-NFKQTI GGVKIEDEEEE--ITYEKT TTTTLRRGTHHLATLQTSD-GHWP	116
Oe_LUP	DLLMRMQLVKEN-QRVQIPPAIKIKETEG--ITEEAVITTLRRAISFYSTIQAHD-GHWP	115
At_CAS	DLLMRLQFSREN-LISPVL PQVKIEDTDD--VTEEMVETTLKRGLDFYSTIQAHD-GHWP	115
At_LAS	DLLYRFQCWKEKGGKMERLPQVKVKEGEERLINEEVVNTLRRSLRFYSILQSQD-GFWP	115
Hs_OSC	REQTGLEAYALG-----LDTKNYFKDLPK---AHTAFEGALN-GMTFYVGLQAED-GHWT	95
Sc_OSC	DPPSTFTQWLLQ---DPKFPQHPER NKHS--PDFSAFDACHNGASFFKLLQEPDSGIFP	96
	: : : . . : * * * : .	

Ps\_BAS AQIAGPLFFMPPLVFCVYITGHLDSVFPPEHRKEILRYIYCHQN-EDGGWGLHIEGHSTM 175  
 Oe\_LUP AESAGPLFFLPPLVLALYVTGAINVLSREHQKEITRYIYNHQN-EDGGWGIHIEGHSTM 174  
 At\_CAS GDYGGPMFLLPGLIITLSITGALNTVLSEQHKQEMRRYLYNHQN-EDGGWGLHIEGPSTM 174  
 At\_LAS GDYGGPLFLLPALVIGLYVTEVLDGTLTAQHQIEIRRYLYNHQN-KDGGWGLHVEGNSTM 174  
 Hs\_OSC GDYGGPLFLLPGLLITCHVARIP---LPAGYREEIVRYLRSVQL-PDGGWGLHIEDKSTV 151  
 Sc\_OSC CQYKGPMMTIGYVAVNYIAGIE---IPEHERIELIRYIVNTAHPVDGGWGLHSVDKSTV 153  
 : \*\*:\* : : : : \* : \*\* : \*\*\*\*\*.\* . \*\* :

Ps\_BAS FCTALNYICMRLGEGPDGGEDNACVRARNWIRQHGGVTHIPSWGKTWLSILGVFDWLG 235  
 Oe\_LUP FGSVLSYITLRLGEGQEDGEDKAVARGRKWILDHGGAVGIPSWGKFWLTVLGVYEWDC 234  
 At\_CAS FGSVLNYVTLRLGEGPNDG-DGDMEKGRDWILKYGGATNITSWGKMWLSVLGAFEWSGN 233  
 At\_LAS FCTVLSYVALRLMGEELDGG-DGAMESARSWIHGHGGATFIPSWGKFWLSVLGAYEWSGN 233  
 Hs\_OSC FGTALNYVSLRILGVGPDDP---DLVRARNILHKKGGAVAIPSWGKFWLAVLNVSWEGL 208  
 Sc\_OSC FGTVLNYVILRLLGLPKDHP---VCAKARSTLLRLGGAIGSPHWGKIWLSALNLYKWEV 210  
 \* :.\*.\* :.\*.\* : . \* : \*\* . \*\*\* \*\* : \* . :.\* \*

Ps\_BAS NMPPEFWILPSFLPMHPAKMWCYCRLVYMPMSYLYGKRFVGPITPLILQLREELHTEPY 295  
 Oe\_LUP NMPPEFWLLPNFSPIHGKMLCYCRLVYMPMSYLYGKRFVGPITGLVLSLRQEIYTEPY 294  
 At\_CAS NPLPPEIWLPLYFLPIHPGRMWCHCRMVYLPMSYLYGKRFVGPITSTVLSLRKELFTVPY 293  
 At\_LAS NPLPELWLLPYSLPFHPGRMWCHCRMVYLPMSYLYGRRFVCRNTGTILSLRRELYTIPY 293  
 Hs\_OSC NTLFPEMWLFPDWAPAHPSLWCHCRQVYLPMSYCYAVRLSAAEDPLVQSLRQELYVEDF 268  
 Sc\_OSC NPAPPETWLLPYSLPMHPGRWVWHTRGVYIPVSYLSLVKFSCPMTPLLEELRNEIYTKPF 270  
 \* . \*\* \* :.\* \* \*\* . : \* \*\* :.\* \*\* : : . \*\* :.\* : . :

Ps\_BAS EKINWTKTRHLCAKEDIYYPHPLIQDLIWDSLIFYFTEPLLTRWPFNKLVRKRALEVTKH 355  
 Oe\_LUP HGINWNRARNTCAKEDLYYPHPLAQDMLWGFLHHFAEPVLTRWPFKLR-EKALKVAMEH 353  
 At\_CAS HEVNWNEARNLCAKEDLYYPHPLVQDILWASLHKIVEPVLMRWPGANLR-EKAIRTAIEH 352  
 At\_LAS HHIDWDTARNQCAKEDLYYPHPKIQDVLWSCLNKFGPELLERWPLNLR-NHALQTVMQH 352  
 Hs\_OSC ASIDWLAQRNNVAPDELYTPHSWLLRVYALLN-----LYEHHSAPHLR-QRAVQKLYEH 322  
 Sc\_OSC DKINFSKNRNTVCGVDLYYPHSTTLNIANSLVVFYEKYLRNRFIYSLSK-----KKVYDL 325  
 ::: \* : . :.\* \*\* . : : : : . .



Ps_BAS	IHYEDENSRYLTI GCVKVLCLACWVED-PNGDAFKKHIARVPDYLWISEDGMTMQSF-	413
Oe_LUP	VHYEDMNSRYLCI GCVKVLCLIACWVED-PNSEAYKRHIARI PDYFWVAEDGLKMQSF-	411
At_CAS	IHYEDENTRYI CI GPVNKVLNMLCCWVED-PNSEAFKLHLPRI HDFLWLAEDGMKMQGYN	411
At_LAS	IHYEDQNSHYI CI GPVNKVLNMLCCWVES-SNSEAFKSHLSRI KDYLWVAEDGMKMQGYN	411
Hs_OSC	IVADDRFTKSI SIGPI SKTINMLVRWYVDGPASTAFQEHVSRI PDYLMGLDGMKMQGTN	382
Sc_OSC	IKTELQNTDSL CI APVNQAFCALVTLEEGVDSEAFQRLQYRFKDALFHGPQGMTIMGTN	385
	: : : : * . : : : : : . . * : : * . * : : . : * : : .	
Ps_BAS	GSQEWDAGFAVQALLATN--LIEEIKPALAKGHDFIKKSQVTENPSGDFKSMHRHISKGS	471
Oe_LUP	GCQMWDAAFAIQAILSSN--LAEEYGPTLMKAHNFVKA SQVQENPSGDFNEMYRHTSKGA	469
At_CAS	GSQLWDTGFATQAILLATN--LVEEYGPVLEKAHSFVKNSQVLEDCPGDLNYWYRHI SKGA	469
At_LAS	GSQLWDVTLAVQAILLATN--LVDDYGLMLKKAHNYIKNTQIRKDTSGDPGLWYRHPCKGG	469
Hs_OSC	GSQIWDTAFATQALLEAGGHRPEFSSCLOKAHEFLRLSQVDPNPP-DYQKYRQMRKGG	441
Sc_OSC	GVQWDCAFATQYFFVAGLAERPEFYNTIVSAYKFLCHAQFD---TECVPGSYRDKRKGGA	442
	* * * * : * . * : : : : : : : : : : * . : * . * * .	
Ps_BAS	WTFSDQDHGWQVSDCTAEGLKCCLLLSLLPP-EIVGEKMEPERLFDVSNLLLSLQSKK--	528
Oe_LUP	WTFSMQDHGWQVSDCTAEGLKAALLFSQMPI-ELVGAEIETGHLVDVNNVILTLQSAS--	526
At_CAS	WPFSTADHGWPI SDCTAEGLKAALLSKVPK-EIVGEPI DAKRLYEAVNVI I SLQNAD--	526
At_LAS	WGFSTGDNWPVSDCTAEALKAALLSQMPV-NLVGEPMPPEHLVDVNFILSLQNKN--	526
Hs_OSC	FSFSTLDCGWI VSDCTAEALKAVLLLQEKCP-HVT-EHIPRERLCDAVAVLLNMRNPD--	497
Sc_OSC	WGFSTKTQGYTVADCTAEAIKAIIMVKNSPVFSEVHHMISSERLFEGIDVLLNLQNI GSF	502
	: * * : : * * * * . * . : : : . : : * : : : : : : .	
Ps_BAS	--GGLAAWEPAGAQEWELELLNPTEFFADIVVEHEYVECTGSAIQALVLFKKLYPGHRKKE	586
Oe_LUP	--GGFPAWEPQKAYRWLEKLNPTTEFFEDVLI ERDYVECTSSAVQALKLQHPGHRKKE	584
At_CAS	--GGLATYELTRSYPWLELINPAETFGDIVIDYPYVECTSAAIQALISFRKLYPGHRKKE	584
At_LAS	--GGFASYELTRSYPELEVINPSETFGDII IDYQYVECTSAAIQGLVLF TTLNSSYKRKE	584
Hs_OSC	--GGFATYETKRGGHLELLNPSEVFGDIMIDYTYVECTSAVMQALKYFHKRFPEHRAAE	555
Sc_OSC	EYGSFATYEKIKAPLAMETLNPAEVFGNIMVEYPYVECTDSSVLGLTYFHKYFD-YRKEE	561
	* . : : : * . : * : * * * * : : : : * * * * . : : * * : : *	

Ps_BAS	IENFIFNAVRFLEDTQTEDGSWYGNWGVCFITYGSWFALGGLAAAGKTYTN---CAAIRKG	643
Oe_LUP	IASCI SKAIQYIEATQNPDGSDGSGWICFTYGTWFAVEGLVACGKNYHN---SPTLRRA	641
At_CAS	VDECIEKAVKFIESIQAADGSWYGSWAVCFITYGTWFGVKGLVAVGKTLKN---SPHVAKA	641
At_LAS	IVGSINKAVEFIEKTQLPDGSDWYGSWGVCFITYATWFGIKGMLASGKTYES---SLCIRKA	641
Hs_OSC	IRETLTQGLEFCRRQQRADGSWEGSWGVCFITYGTWFGLEAFACMGQTYRDGTACA EVSRA	615
Sc_OSC	IRTRIRIAIEFIKKSQLPDGSDWYGSWGVCFITYAGMFALEALHTVGETYEN---SSTVRKG	618
	: : : . : . : * **** * . : : **** . * : : : * : . . . : : .	
Ps_BAS	VKFLTTQREDGGWGESYLSPPKKIYVPLEGNRSNVVHTAWALMGLIHAGQSERDPTPLH	703
Oe_LUP	CEFLLSKQLPDGGWSESYLSSSNKVYTNLEGNRSNLVQTSWALLSLIKAGQVEIDPGPIH	701
At_CAS	CEFLLSKQPPSGGWGESYLSQDKVYSNLDGNRSHVVNTAWAMLALIGAGQAEVDRKPLH	701
At_LAS	CGFLLSKQLCCGGWGESYLSQNKVYTNLPGNKSHIVNTSWALLALIEAGQASRDPMPLH	701
Hs_OSC	CDFLLSRQMDGGWGEDFESCEERRY--LQSAQSQIHNTCWAMMGLMAVRHPDIEAQ--E	671
Sc_OSC	CDFLVSKQMKDGGWGESMKSSE--LHSYVDSEKSLVVQTAWALIALLFAEYP—NKEVID	674
	** : : * **** * . * : : : * : : * : : * : : * : : * : . . . : .	
Ps_BAS	RAAKLLINSQLEQGDWPQOEITGVFMKNCLHYPMYRDIYPLWALAEYRRRVPLP-----	758
Oe_LUP	RGIKLLVNSQMEDGDFPQOEITGAFMKNCTLNYSSYRNIFPIWALGEYRRRILHAQT---	758
At_CAS	RAARYLINAQMENGDFPQOELMGVFNRCMITYAAYRNIFPIWALGEYRCQVLLQOGE--	759
At_LAS	RGAKSLINSQMEDGDYPQOELGAVFNRCMISYSAYRNIFPIWALGEYRKLMLSL-----	756
Hs_OSC	RGVRCLEKQLPNGDWPQENIAGVFNKSCAISYTSYRNIFPIWALGRFSQLYPERALAGHP	732
Sc_OSC	RGIDLLKNRQEEESGEWKFESVEGVFNHSCATEYPSYRFLFPIKALGMYSRAYETHTL---	731
	* . * : * * : : * : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	

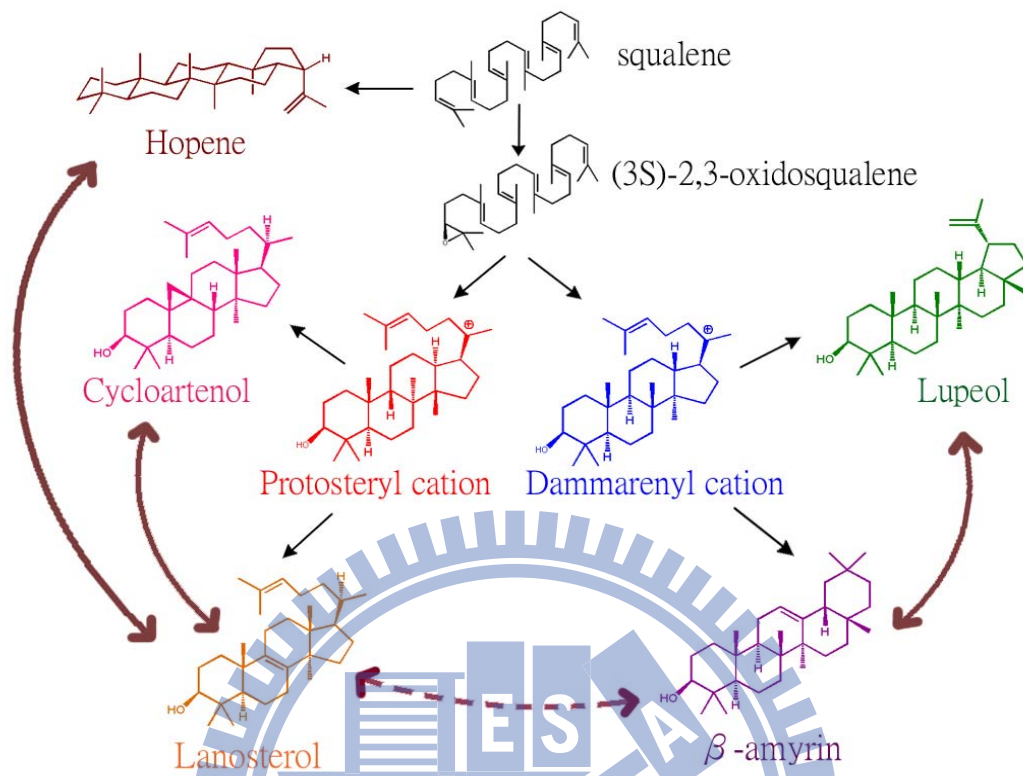
《圖1-28》 *P.sativum*的BAS、*O.Europa*的LUP、阿拉伯芥 (*A.Thaliana*) 之CAS、阿拉伯芥 (*A.Thaliana*) LAS、人類 (*H.sapiens*) 之OSC以及酵母菌 (*S.cerevisiae*) 之OSC彼此間序列比對。

## 1.6 研究目的

氧化鯊烯環化酵素在三萜類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，分子量大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<sup>64</sup>，以及進行定點突變的實驗，藉由觀察產物來探討反應機制。

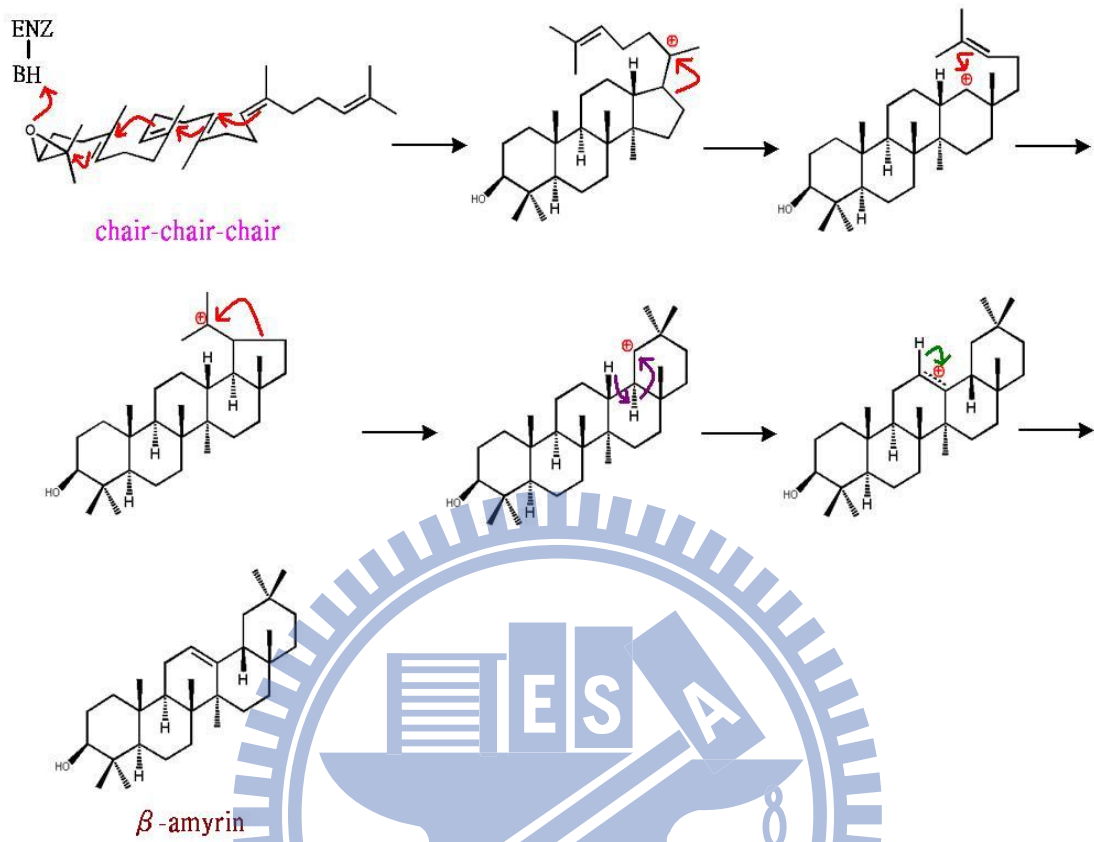
此研究題目主要是想要利用定點突變的方式研究氧化鯊烯環化酵素家族之間彼此的關係《圖1-29》，在先前的研究之中有研究了突變SHC上面三個胺基酸到OSC相對應的胺基酸，嘗試使得原本將鯊烯當作是受質的SHC也能將氧化鯊烯當作是酵素的受質，而這個胺基酸的三點突變是D377C/V380E/V381A，這個定點飽和實驗成功的使得SHC將氧化鯊烯當作是受質，而且產生了產物3-hydroxyhopene<sup>74</sup>。而在CAS和OSC之間的關係中，研究人員利用定點飽和突變將CAS上面的胺基酸突變成OSC中相對應的胺基酸，分別是Y410T、H477N、I481V，成功的使得CAS產生了OSC的產物羊毛硬脂醇，並在雙突變H477N/I481V中，更得到高達99%的羊毛硬脂醇，這在先前的緒論也有詳細的說明。此外，在LUP和BAS兩者之間也可經由突變成彼此相對應的胺基酸Leu256W(OEW)和Trp259L(PNY)而產生對方的產物。

註：PNY的Trp259對應於PSY為Trp257

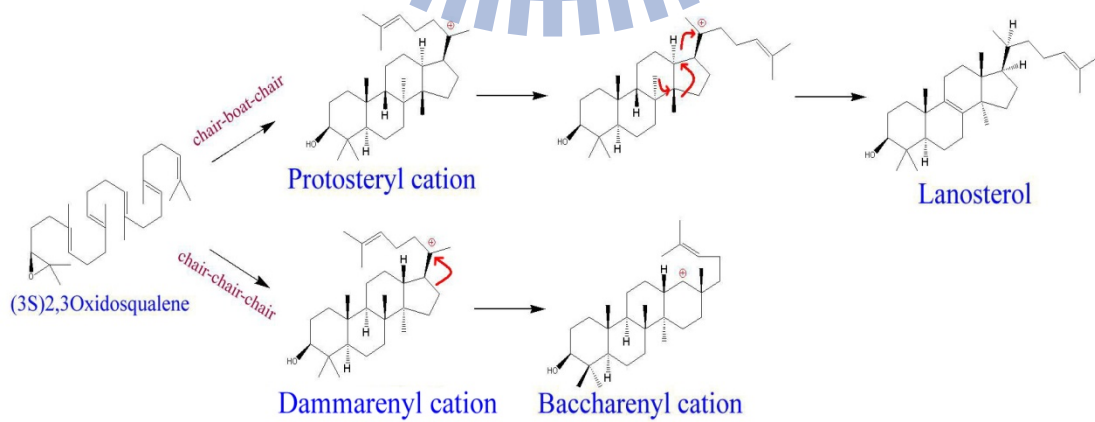


《圖1-29》各物種間氧化鯊烯環化酵素相關性研究圖

在這些彼此的關係研究中，OSC和BAS之間的差異為何，這點在先前的研究以及文獻鮮少提及，這兩者之間除了OSC為椅形-船形-椅形的原脂醇碳陽離子，BAS為椅形-椅形-椅形的達瑪烯碳陽離子中間物之外，最大的不同點在於形成這兩個在C<sub>20</sub>陽離子中間產物它們之後的步驟，原脂醇碳陽離子會進行數個重排的步驟最後在C<sub>9</sub>的位置脫氫產生羊毛硬脂醇，而達瑪烯碳陽離子中間物則會繼續進行環化反應形成Baccharenyl Cation intermediates，之後經過擴環、環化、重排的步驟形成 $\beta$ -香桂素《圖1-30》《圖1-31》。



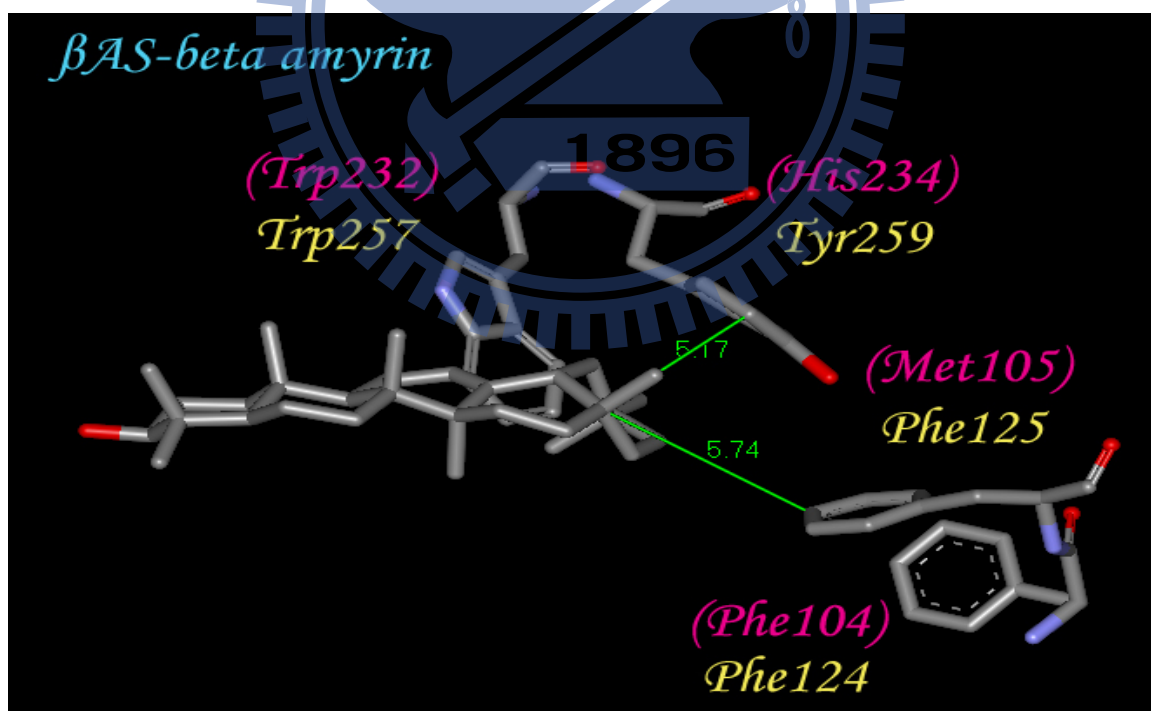
《圖1-30》BAS反應機制表示圖



《圖1-31》OSC和BAS之間反應機制的差異

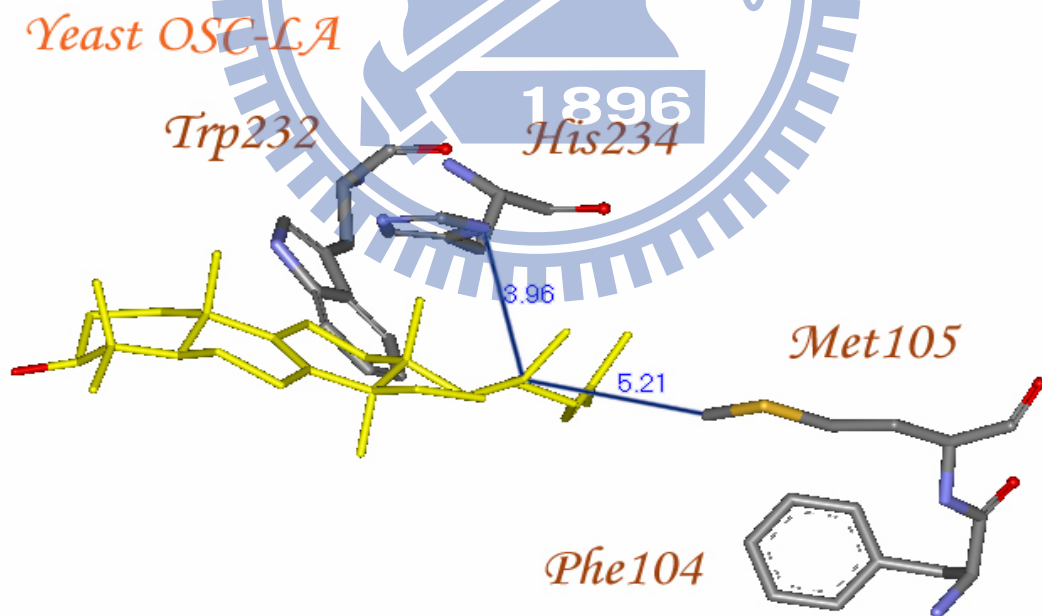
在這C20陽離子的環化與否引導出研究的方向，由於在先前的研究上面從未嘗試過把原脂醇碳陽離子朝著環化的步驟進行，因此在此研究目的希望能使得原本進行重排的原脂醇碳陽離子繼續進行擴環、環化而有不同立體構形的6-6-6-6四環產物或是五環的產物產生。

藉由生物資訊模擬的方式以人類OSC的結晶結構當作試模板找出BAS C20周圍的胺基酸，發現這些胺基酸為《圖1-32》所示，其中和OSC中不同的胺基酸為Tyr259和Phe125；根據芳香族胺基酸穩定碳陽離子的假說，這兩個胺基酸可能就是影響是否繼續進行環化的重要胺基酸。



《圖1-32》BAS結構模擬圖中C20周圍之胺基酸

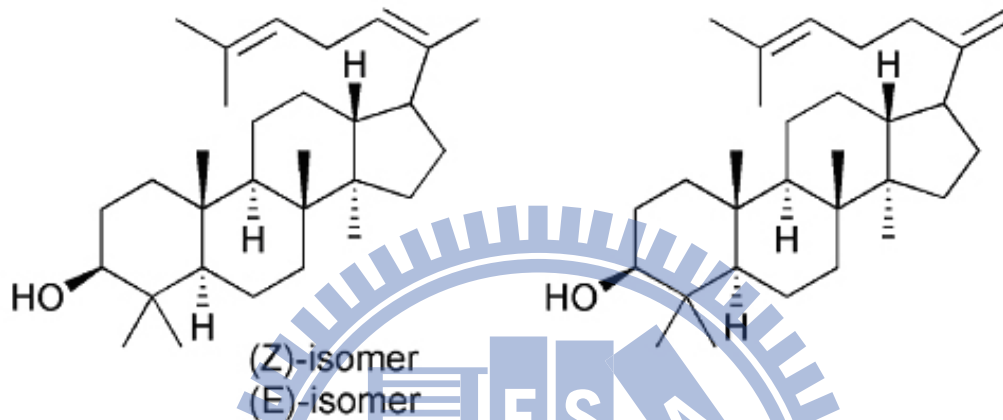
但是在先前的研究已經完成了H234的定點飽和突變產物分析，只有發現單環、三環以及四環的產物，並未發現有擴環或是繼續環化的產物，根據這點，希望能從OSC的結構模擬中找出答案《圖1-33》，發現H234的功能除了使得重排的位置正確之外，可能也是使原脂醇碳陽離子的長碳鏈有180度旋轉的一個重要因素，因為它和受質的距離只有3.96埃，由於空間的因素導致長碳鏈有外翻的動作，根據反應機制來說，尾部的長碳鏈要維持在特定的角度之上才可以繼續進行擴環和環化的反應，Tyr259也就扮演了這個角色，而H234產生的立體障礙使得長碳鏈進行旋轉而生了重排反應，也就是阻斷了擴環以及環化的進行。



《圖1-33》OSC的結構模擬圖中C20周圍之胺基酸



關於上面這一點的假設也可以在先前對於BAS的研究上面得到證實：  
利用序列比對可得知BAS中的Tyr261(PNY)對應於OSC的H234，之後進行Tyr261H的定點突變之後，發現其產物為《圖1-34》。



《圖1-34》飽合定點突變實驗中PNY的Tyr261H所產生的三種產物左邊兩種異構產物即可發現尾端長碳鏈的角度是完全不同的，因此可推論H234過近的距離所造成的立體障礙會使得在C20碳陽離子形成之後有著”甩尾”的動作產生，也關係著下一個步驟為擴環亦或是重排反應。

既然H234被推論是重排以及側鏈旋轉的重要胺基酸，那麼，BAS上的Phe125對應於OSC為M105是否就是擴環與否的重要胺基酸呢？

對於這個疑問，進行了序列比對的動作《圖1-35》，找尋在不同物種間相同位置是否有高度保留或是有著相異的胺基酸，在比對後發現會進行擴環反應的LUP和BAS皆為Phe這個芳香族的胺基酸，而進行重排卻沒有進行擴環反應的OSC和CAS則為輸水性的長碳鏈胺基酸。

Ps_BAS	117	AENAGPLF	F	LPPLVMCLY	133
Oe_LUP	116	AESAGPLF	F	LPPLVLALY	132
At_CAS	116	GDYGGPLF	L	LPALVIGLY	132
At_LAS	116	GDYGGPMF	L	LPGLIITLS	132
Hs_OSC	96	GDYGGPLF	L	LPGLLITCH	112
Sc_OSC	95	CQYKGPMF	M	TIGYVAVNY	111

《圖1-35》不同物種間的序列比對

結合上面論述，必須先將H234這個立體障礙除去之後穩定C20碳陽離子，才可能有擴環的可能性。因此就直接進行雙點突變，將M105突變成Phe。而H234突變成BAS相對應的Tyr以及兩種較小的胺基酸Gly和Ala；也就是對於OSC的M105F+H234G/A/Y進行產物的分析。

在雙突變 M105F+H234G/A/Y 結果出來之後，更使得我們好奇 OSC 中 Met105 以及 BSA 中 Phe125 的功能性為何？因此接下來進行了這兩個點的定點飽和突變。當然，首先做的也就是 OSC 的 M105F 以及 BAS 的 Phe125M，希望能藉此找出雙突變點所產生結果的原因。為了找出更加清楚明白的原因，也進行了定點飽和突變的實驗。

## 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

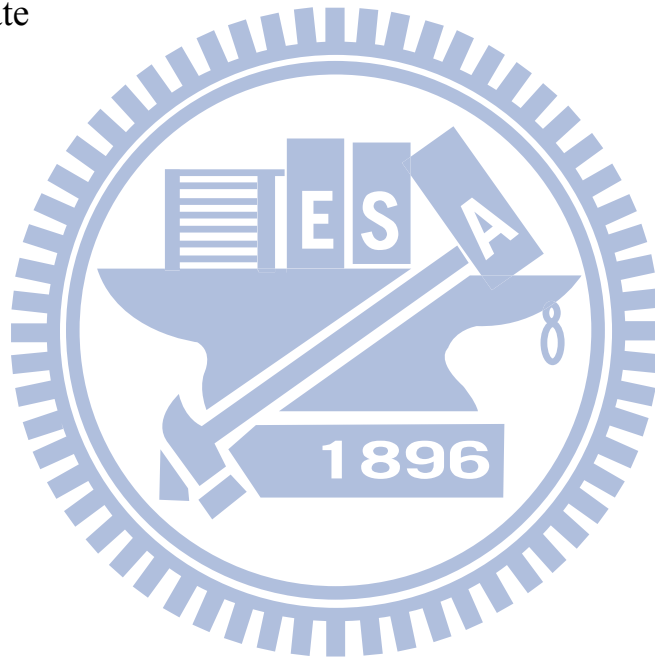
Methioine

Pyridine

Tryptophan

Uracil

以上皆購自於 **Sigma**



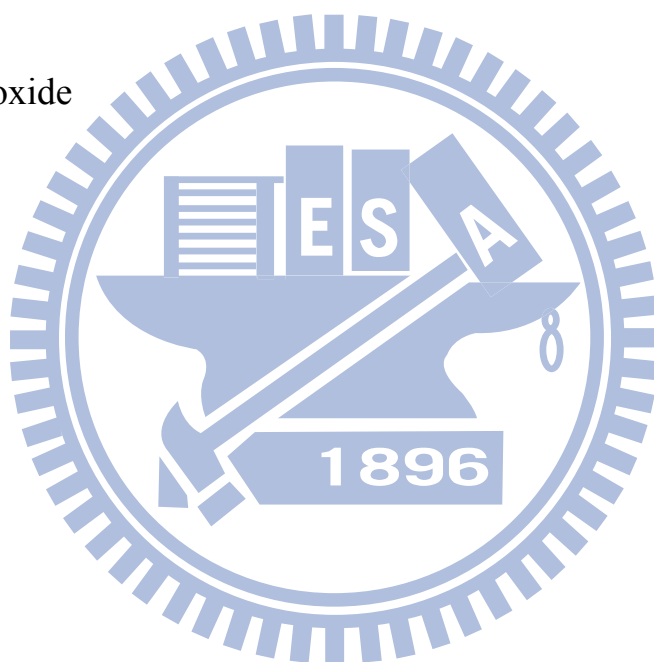
Acetic acid

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**

BactoTMAgar

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**

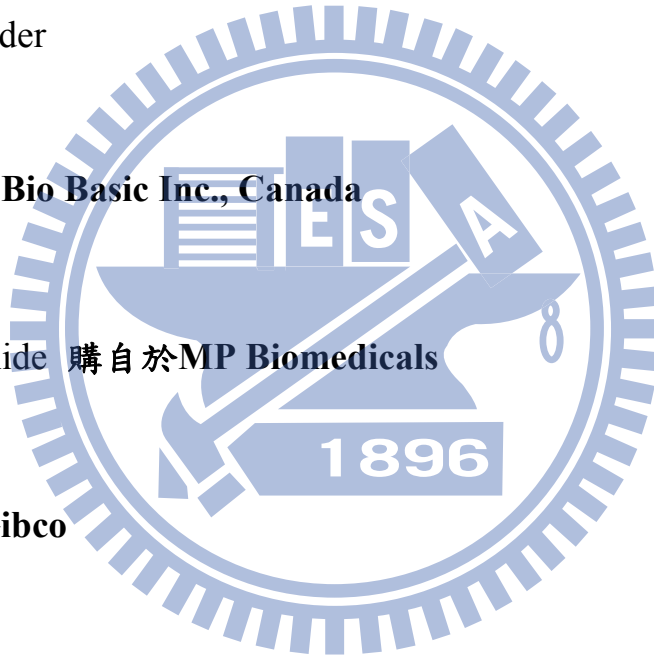
Dimethyl sulfoxide 購自於**MP Biomedicals**

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

### 2.1.2.1 定序套組

BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit 購自於 Applied Biosystems

### 2.1.2.2 質體取得套組

GFXTM 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*△::*LEU2* *ade2-101 his3-△200 leu2-△1 lys2-801 trp1-△63* [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*之菌珠 其基因型為MATa or MATα *ERG7Δ::*

*LEU2 ade2-101 his3-Δ200 leu2-Δ1 lys2-801 trp1-Δ63 ura3-52*

*hem1Δ::KanR*), 可供菌珠選殖篩選用。

## 載體 RS314 :

購自於New England BioLabs公司。載體 RS314 是可穿梭於酵母菌

*S.cerevisiae* 和大腸桿菌*E.coli* 間的載體, 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 μM 濾膜過濾, 去除雜菌, 儲存於 -20 °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°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°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°C。

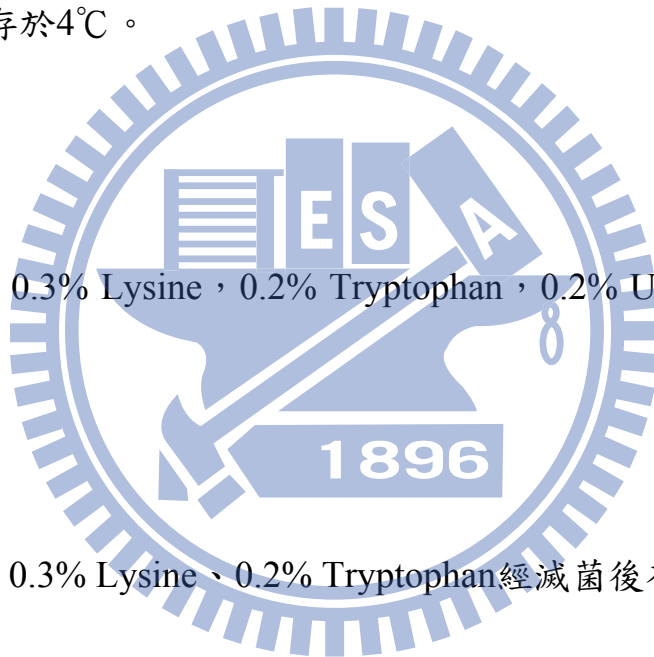
### **50 X ALTU :**

0.2% Adenine, 0.3% Lysine, 0.2% Tryptophan, 0.2% Uracil, 經高壓滅

菌後存於4°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20ml 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。

### **YNB medium**

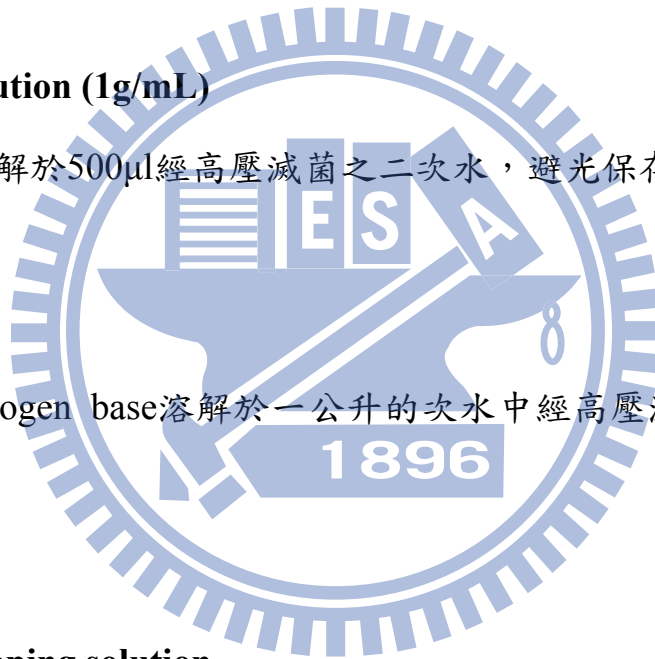
6.7g Yeast nitrogen base溶解於一公升的次水中經高壓滅菌後儲存於常溫。

### **20% EA developing solution**

將Ehyl acetate與Hexane以1 : 4互相混合。

### **TLC staining solution**

緩慢的將95% Erhanol、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MgCl<sub>2</sub> 溶於100ml的一次水中並調至pH 9.0，保存於4°C。

### **10X SYBR Green solution**

DMSO 稀釋10,000X SYBR Green stock solution 至10X，於-20°C避光。

### **6X DNA loading dye**

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

### **Hemin 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/Hemin/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 Hemin 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。

### **2.1.5 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-Nseries)

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 970 )

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)

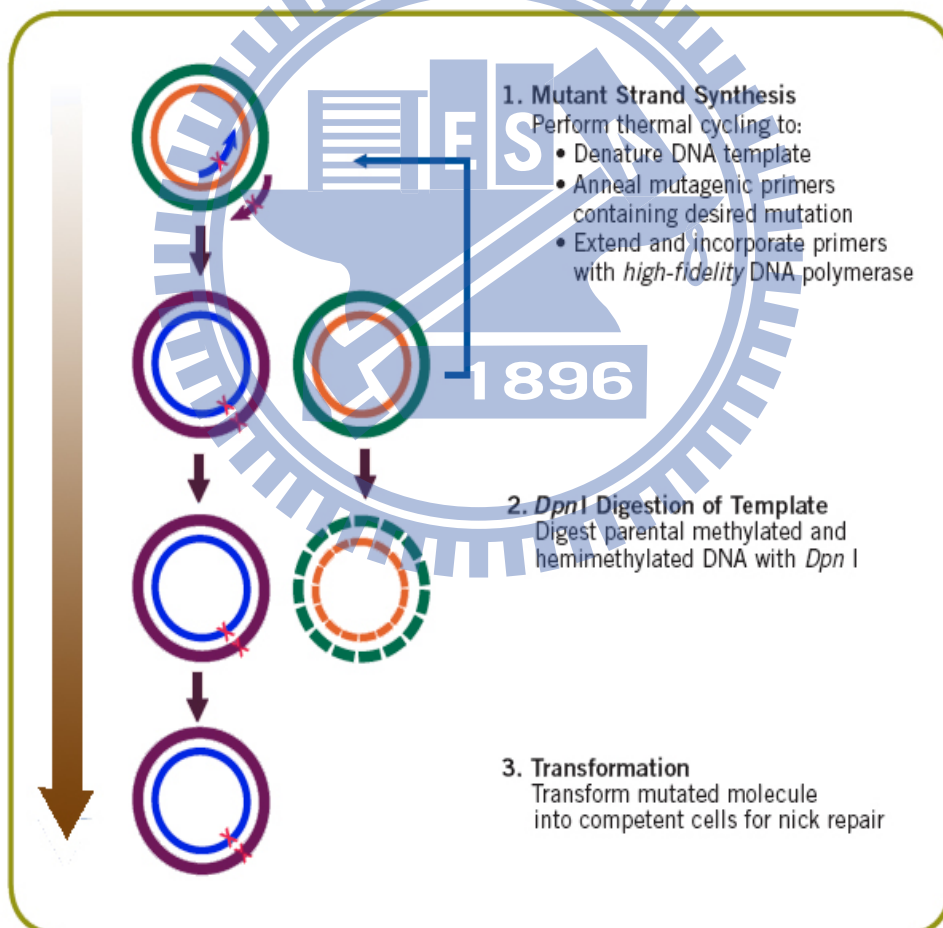
脈衝控制器 (BioBad , Pulse Controller)



## 2.2 實驗方法

### 2.2.1 重組質體的建構

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。

TCH-YOSC-M105F-ApaI-1	5'CAA TAT AAA <u>ggg CCC</u> ATg TTC TTT ACA ATC gg'
TCH-YOSC-M105X-ApaI-1	5'CAA TAT AAA <u>ggg CCC</u> ATg TTC NNN ACA ATC gg'
TCH-PSY-F125X-ApaI-1	5'CAA ATT gCA <u>ggg CCC</u> CTA TTT NNN ATg CCT CC 3'

《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
Pfu polymerase	0.4

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

segment	cycles	temperature	time
1	1	95°C	2 min
2	25	95°C	30 sec
		53°C	1 min
		68°C	8min
3	1	68°C	5min
4	1	4°C	10min

《表 2-3》 QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit 所使用之聚合酵素

### 放大步驟

#### (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	12
10× NE Buffer 4	1.5
<i>Dpn</i> I	1.5

《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3ml 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1,000ml的SOB培養液 (含有0.02 M的MgCl<sub>2</sub>)，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OD<sub>600</sub>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320ml TB buffer清洗pellet，並重複上述條件離心之。倒除上清液後，以80ml TB buffer重新懸浮菌體，繼而加入5.6 ml的DMSO冰浴十分鐘。取350μl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100μl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1ml的LB試管中，以37°C、200 rpm震盪條件培養一小時後，將菌液以6,000rpm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18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水浴槽中反應三小時，再以DNA 電泳來確定質體是否含有所設計之突變點。

reagents	Volume (μl)
Plasmid	0.5~3(視切後片段大小而定)
10× NE Buffer	1
Enzyme	0.5
DDW	5.5~8

《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SangerMethod (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 (μl)
Template	2
5X Sequencing Buffer	3
Primer	1
DDW	13.2
BigDye 3.1	0.8

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

segment	cycles	temperature	time
1	1	95°C	2 min
2	25	96°C	10 sec
		50°C	5 sec
		60°C	4 min
3	1	4°C	10min

《表 2-7》 BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit 所用溫度

## 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Hemin基因已被置換掉，這是因為在先前的報導有指出在Hemin基因被置換掉無法正常產生Hemin的情況之下，酵母菌才會攝取Ergosterol，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Hemin基因相關，當Hemin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YNB（with ALTHMU/ hemin/ Ergosterol/ Glucose）試管在30°C後以200rpm 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OD<sub>600</sub> 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50μl× n（n 為所需轉殖的樣品數目）之D-sorbitol溶液。之後取50μl菌液混和5μl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2mm的電穿透玻璃管，

設定玻璃管入脈衝控制器條件為1.5kV, 200  $\Omega$ , 25  $\mu$ F以進行電穿透作用。在電擊後立刻加入500 $\mu$ l無菌的1M D-sorbitol溶液將細胞懸浮混勻，最後取120  $\mu$ l的菌液塗佈在YNB plate中（with ALHMU/ Hemin/ Ergosterol/ Glucose），於30 $^{\circ}$ C恆溫箱中培養3至5天待其菌落生長，因為質體RS314會產生Trp，故當質體成功電入TKW14C2中時即可只在ALHMU的盤上生長出菌落之後即可進行Ergosterol功能性補充篩選分析。

## **(2) CBY57**

於-80 $^{\circ}$ C冰箱中取出CBY57菌株，接種於3ml的YNB（with ALTH/Glucose）試管中在30 $^{\circ}$ C、200 rpm 震盪條件下培養約三天後，將菌液倒入100ml含相同培養液的條件下培養至其OD<sub>600</sub>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YNB 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；因為若是突變使得酵素無產生 Lanosterol 進而無法產生下游的 Ergosterol，在缺少 Ergosterol 的盤上是無法生長的，故可以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 GC-Mass 圖譜。

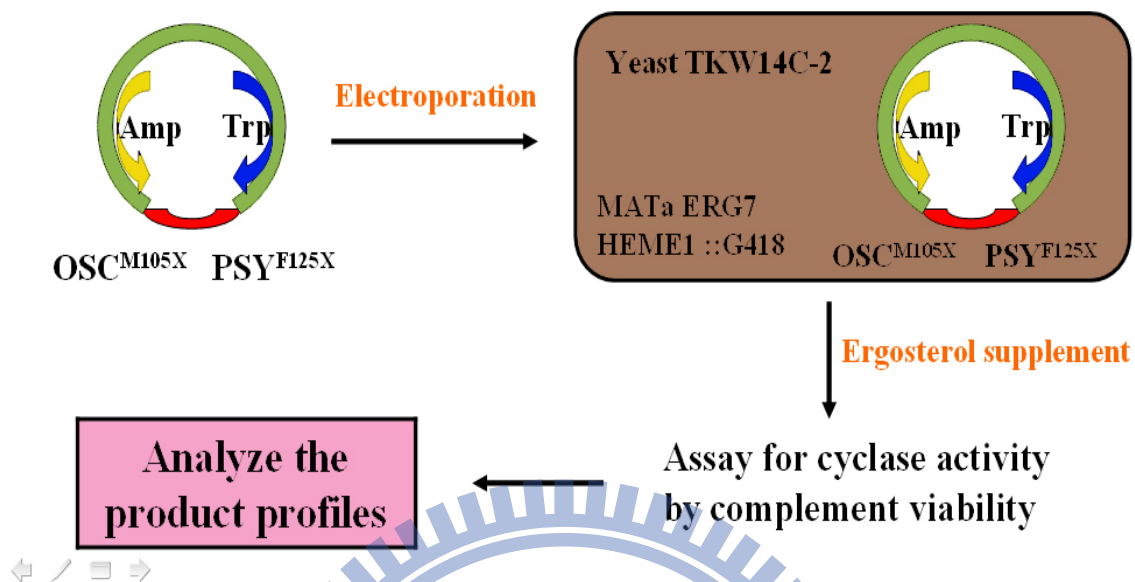
## (2) 質體交換與反向篩選

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 3ml YNB (with ALHU/ Glucose) 中 30°C、200rpm 震盪條件培養一天；此步驟是為了使得 CBY57 有機率將 PZS11 丟棄，因為 PZS11 會產生 Urea，培養液中也含有 Urea。接下來取少量菌液依序劃眉於以下兩組培養皿：YNB + Glucose + Ade+ Lys + His + Ura (對照組) 與 YNB + 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 YNB + 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YNB + 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3ml 的YNB 中（with ALHMU/ Hemin/ Ergosterol）於37°C、200 rpm 震盪條件下培養約三至五天。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2.5L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進行產物的分析《圖2-2》。



《圖2-2》產物分析流程示意圖

## 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。接著利用旋轉減壓濃縮機乾燥並加入少量矽粉，使得產物均勻包裹於矽粉之上，以等待進行管柱層析。

## 2.2.6 管柱液相色層分析

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100ml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 ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) 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旋轉減壓機濃縮。

## 2.2.7 薄層色層分析 (Thin Layer Chromatography)

將試管中的樣品各取500 $\mu\text{l}$ 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板 (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 Agilent122-5731DB-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，加熱口條件為起始溫度50°C，持續1分鐘，之後已每分鐘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 Model5973MYNB型號，程式設定為溶劑延遲偵測7分鐘，掃描範圍50~550Da，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](http://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 $ERG7^{M105F+H234G/A/Y}$ 功能性分析

#### 3.1.1 建構 $ERG7^{M105F+H234G/A/Y}$ 的雙點突變株

要建構酵母菌 $ERG7^{M105F+H234G/A/Y}$ 的定點飽和突變株，首先先取得之前實驗室在進行H234定點飽和實驗時所得到的 $ERG7^{H234G/A/Y}$ ，之後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（Met105）設計成產生胺基酸Phe的序列（即TTT）。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確性。接下來我們利用已經建構好分別含有單點突變 $ERG7^{H234G/A/Y}$ 基因的質體pRS314 $ERG7^{H234G/A/Y}$ 作為母股，並以所設計的引子對進行聚合酶連鎖反應，即可產生擁有雙突變點的 $ERG7^{M105F+H234G/A/Y}$ 。

#### 3.1.2 $ERG7^{M105F+H234G/A/Y}$ 突變株功能性補充篩選以及 產物分析與討論

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*- $\Delta$ 1 *lys2*-801 *trp1*- $\Delta$ 63 *ura3*-52 )與CBY57( MATa *ERG7* $\Delta$ :: *LEU2* *ade2-101* *his3*- $\Delta$ 200 *leu2*- $\Delta$ 1 *lys2*-801 *trp1*- $\Delta$ 63 [ 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

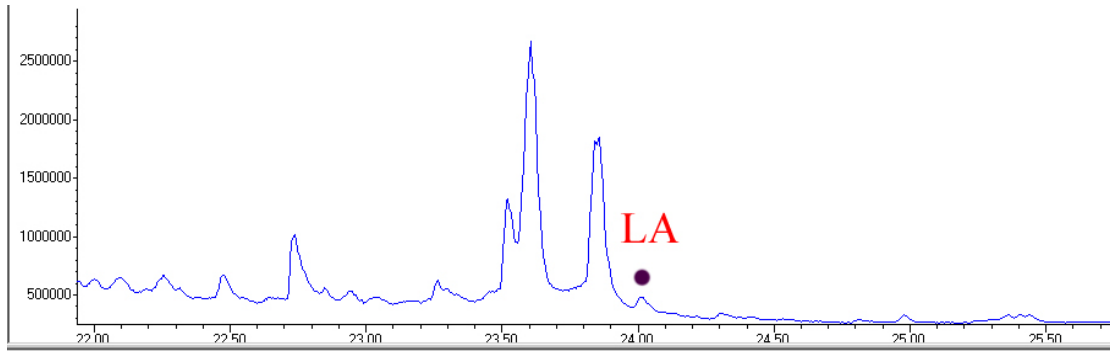
經由突變後，胺基酸的置換對於環化酵素是否有重要的影響；在進行經

過功能性篩選後，我們經過產物取得與鑑定的步驟(實驗方法2.2.4-2.2.8)，

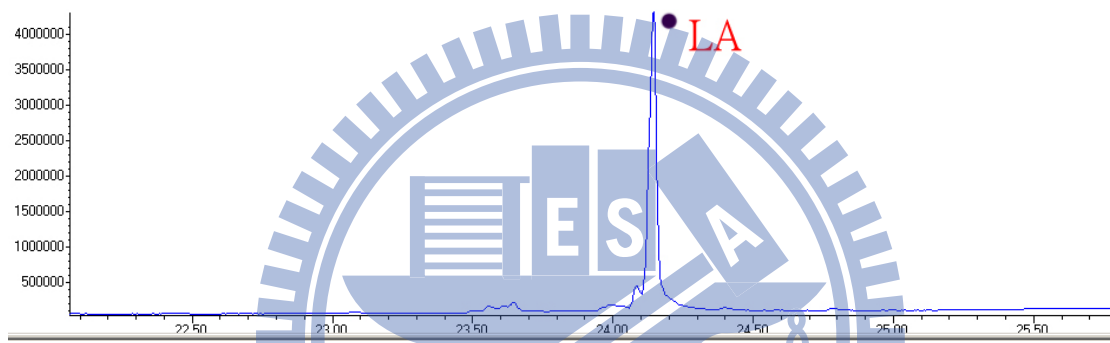
得知突變後酵素所得到的產物為何《表3-1》。

		Enzyme mapping check	Ergosterol supplement	Counter selection	Products analysis and the percentages
YeastOSC M105F+H234X	Gly	V	+	+	LA (minor)
	Ala	V	-	-	No product
	Tyr	V	-	-	No product

《表 3-1》酵母菌 *ERG7*<sup>M105F+H234G/A/Y</sup> 功能性篩選與產物分析表



《圖3-1》 M105F+H234G的GC-MS圖譜，有少量的LA



《圖3-2》野生型ERG7所產生的GC-Mass圖譜，有大量LA

由實驗結果可以觀察到 M105F+H234A/Y 沒有產物的產生，只有 M105F+H234G 有少量的 LA 產生《圖 3-1》，與野生型 ERG7 所產生的 LA 在產量的方面《圖 3-2》，有十分大的差異性，而且也無新的產物產生，根據這結果可以得知這雙點突變對酵素造成十分大的影響，關於這個影響，我們可以綜合 M105 單點突變的結果來討論《表 3-2》。

根據 M105 定點飽和突變結果可以得知突變成較大的胺基酸會造成結構的不穩定或是酵素動力學上面十分大的影響，導致沒有產物或是只有少

量的產物產生，而 M105F 就是其中之一，只產生少量的 LA，因此即使再加上 H234G/A/Y 這個突變點之後也沒有新的產物產生，只有 M105F+H234G 有少量的 LA 產生。

關於 M105 定點飽和突變的實驗詳細結果，將在下一章節進行詳細的討論。

## 3.2 酵母菌 $ERG7^{M105X}$ 功能性分析

### 3.2.1 建構 $ERG7^{M105X}$ 飽和定點突變株

要建構酵母菌  $ERG7^{M105}$  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 (Met105) 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確性。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。

### 3.2.2 ERG7<sup>M105X</sup>突變株功能性補充篩選以及

#### 產物分析與討論

建構完飽和突變質體後，我們利用電穿孔的方式將質體轉殖到宿主細胞中，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Met105位置對酵素環化機制是否具有重要的影響；在進行經過功能性篩選後，我們經過產物取得與鑑定的步驟(實驗方法2.2.4-2.2.8)，得知突變後酵素所得到的產物。



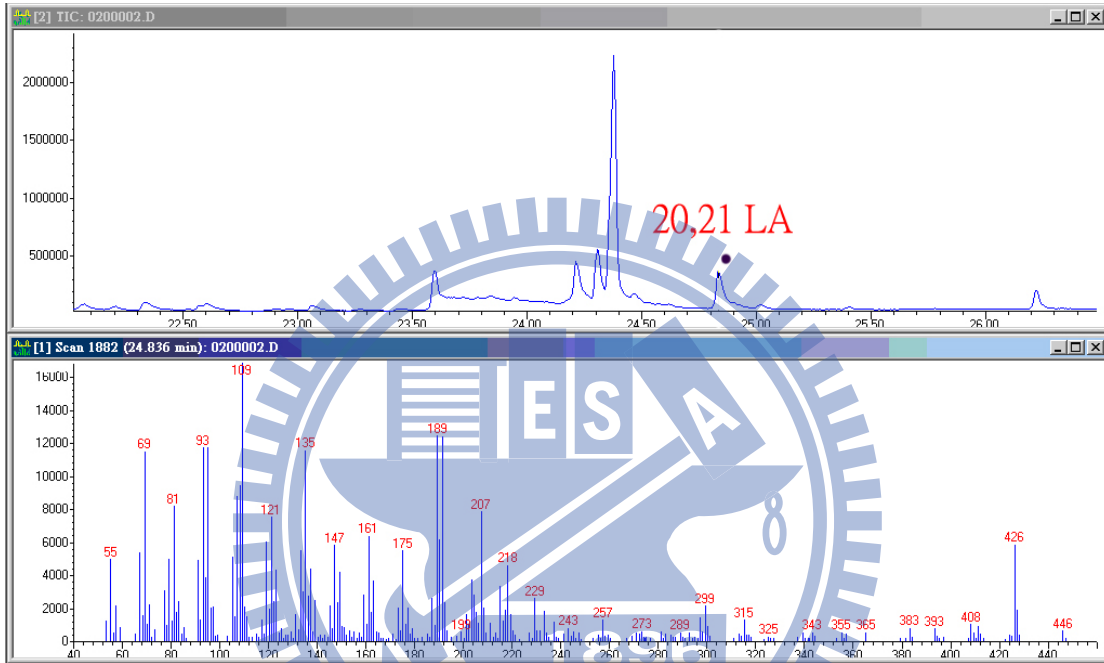
YeastOSC <sup>M105X</sup>		Enzyme mapping check	Ergosterol supplement	Counter selection	Products analysis and the percentages		
Aliphatic group	Gly	V	+	+	LA (72.17%)	20,21LA (27.83%)	
	Ala	V	+	+	LA (97.49%)	20,21LA (2.51%)	
	Val	V	+	+	LA		
	Leu	V	+	+	LA		
	Ile	V	+	+	LA		
Hydroxyl-group	Ser	V	+	+	LA (75.33%)	20,21LA (24.67%)	
	Thr	V	+	+	LA		
Sulfur-containing	Cys	V	+	+	LA		
Acidic group	Asp	V	+	+	LA		
	Glu	V	+	+	LA		
Amide group	Asn	V	+	+	LA (89.24%)	20,21LA (4.51%)	Parkeol (6.25%)
	Gln	V	+	+	LA (62.18%)	20,21LA (37.82%)	
Basic group	His	V	+	+	LA		
	Lys	V	+	+	LA (14.33%)	20,21LA (85.67%)	
	Arg	V	—	—	No product		
Aromatic group	Phe	V	+	+	LA(minor)		
	Tyr	V	—	—	Achillol A(minor)		
	Trp	V	—	—	No product		
Imino	Pro	V	+	+	LA		

註：20,21LA：protosta-20,24-dien-3 $\beta$ -ol

《表 3-2》酵母菌 ERG7<sup>M105F+H234G/A/Y</sup> 功能性篩選與產物分析表



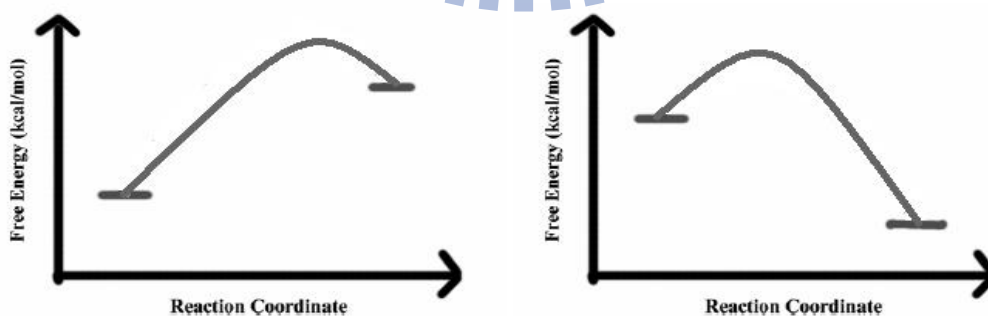
實驗的結果有不同於 LA 的產物，也就是產生 protosta-20,24-dien-3 $\beta$ -ol，至於為什麼會產生 protosta-20,24-dien-3 $\beta$ -ol《圖 3-3》



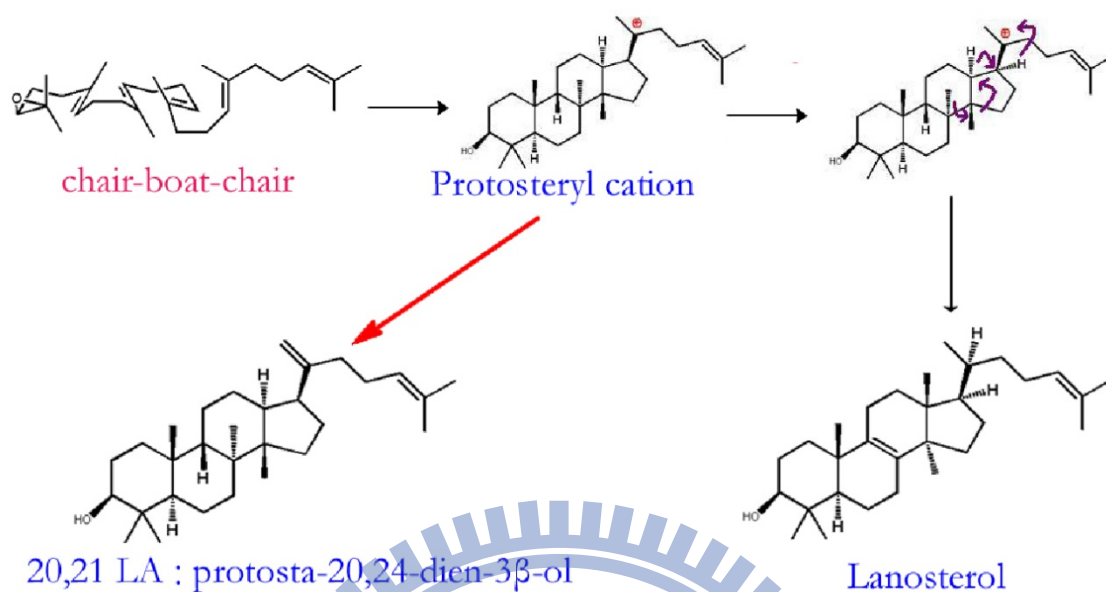
《圖3-3》 M105G GC-MS之protosta-20,24-dien-3  $\beta$  -ol圖譜

由實驗結果可以得知在比較小基團的 Gly、Ala，胺基酸前端有強烈親水性的 Ser、Asn、Gln，帶正電的 Lys 會得到不同比例之 protosta-20,24-dien-3 $\beta$ -ol，而有很大基團的 Arg、Phe、Tyr、Trp 則會產生少量的 Lanosterol、Achillol A，亦或是沒有產物產生，突變成其餘的胺基酸則都有正常量的 Lanosterol 產生。

可以經由反應機制和實驗結果的討論與比對找到 M105 這胺基酸扮演腳色的蛛絲馬跡；在反應機制進行到 C20 的原脂醇碳陽離子之後會行重排反應，而重排反應的第一步就是 C20 陽離子和 C17 上的氫做重排反應，而產生 protosta-20,24-dien-3 $\beta$ -ol 即是陽離子停留在 C 20 的地方並且在 C 21 進行脫氫的反應；根據化學反應的原理，不論是吸熱反應或是放熱反應，生成物的位能升高活化能，就會升高使得反應傾向反應物的方向，而生成物的位能降低活化能，即會降低活化能使得反應傾向生成物的方向《圖 3-4》，根據這種想法，大膽的推論 M105 這個位置必須是疏水性的的胺基酸方可穩定 C 17 的陽離子，假設換成過小、前端親水性或是帶電的基團會使得 C 17 上的陽離子不穩定，使得反應傾向反應物的方向，也就是 C20 的原脂醇碳陽離子，並且被迫在 C 21 的位置進行脫氫的反應而產生 protosta-20,24-dien-3 $\beta$ -ol 《圖 3-5》。



《圖3-4》吸熱反應以及放熱反應與自由能關係之示意圖



《圖3-5》推測產生protosta-20,24-dien-3 $\beta$ -ol的反應機制

在一些擁有較大基團胺基酸的 Arg、Phe、Tyr、Tr 則會使得受質無法進入到正確的位置而只產生少量的少量的 Lanosterol、Achillol A，或是沒有產物產生。

綜合上述結果可以發現 Met105 這個長鍊的疏水性胺基酸在 OSC 中所扮演的腳色是可以穩定 C 17 碳陽離子，進而幫助重排反應順利的進行。

### 3.3 *P.sativum* PSY<sup>F125</sup> 功能性分析

#### 3.3.1 建構PSY<sup>F125</sup>飽和定點突變株

要建構 *P.sativum*PSY<sup>F125</sup> 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 (F125) 設計成隨機的序列 (即 NNN)，用以建構隨機突變株的其他 1 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 PSY 基因的質體 pRS314PSY 作為母股，並以所設計的引子對進行聚合酶連鎖反應。

#### 3.3.2 PSY<sup>F125X</sup>突變株功能性補充篩選以及產物分析與討論

建構完飽和突變質體後，我們利用電穿孔的方式將質體轉殖到宿主細胞中，並依照第 3.1.2 章節所陳述相同的方式進行功能性篩選，雖然 PSY 和 OSC 在受質的摺疊上有所不同，所以即使產物環化以及脫氫位置相同，也幾乎不可能產生相同構形以及化學性質相同的產物，除非此突變點的改變可以同時操控著折疊、環化、脫氫。因此，一定必須額外

補充 Ergosterol 菌落才會生長，但是此步驟其必要性為：可在功能性篩的盤上添加 G418 以避免可能的汙染；在進行經過功能性篩選後，我們經過產物取得與鑑定的步驟(實驗方法 2.2.4-2.2.8)，得知突變後酵素所得到的產物為何《表 3-3》。

YeastOSCF125X		Enzyme mapping check	Ergosterol supplement	Counter selection	Products analysis and the percentages
Aliphatic group	Gly	V	—	—	No product
	Ala	V	—	—	No product
	Val	V	—	—	$\beta$ -amyrin (minor)
	Leu	V	—	—	$\beta$ -amyrin (minor)
	Ile	V	—	—	No product
Hydroxyl-group	Ser	V	—	—	No product
	Thr	V	—	—	No product
Sulfur-containing	Cys	V	—	—	No product
	Met	V	—	—	$\beta$ -amyrin (minor)
Acidic group	Asp	V	—	—	No product
	Glu	V	—	—	No product
Amide group	Asn	V	—	—	No product
	Gln	V	—	—	No product
Basic group	His	V	—	—	No product
	Lys	V	—	—	No product
	Arg	V	—	—	No product
Aromatic group	Tyr	V	—	—	$\beta$ -amyrin
	Trp	V	—	—	$\beta$ -amyrin (minor)
Imino	Pro	V	—	—	No product

《表 3-3》*P.sativum* PSYF<sup>125X</sup> 功能性篩選與產物分析表

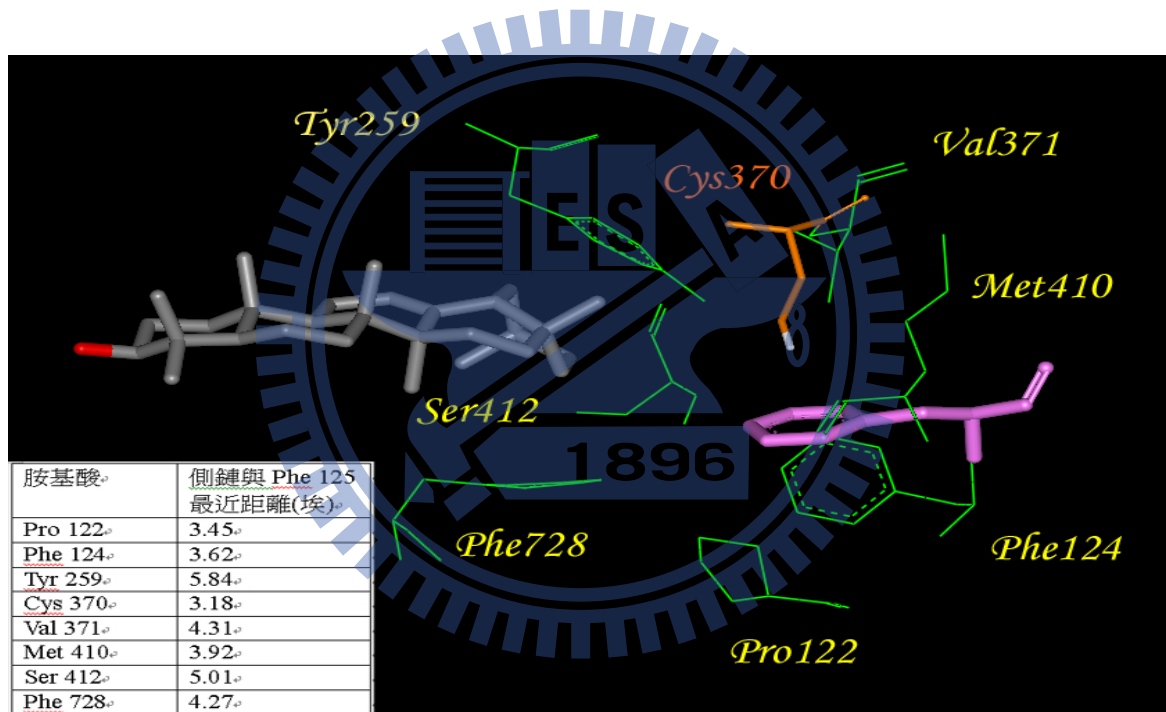
由實驗結果可以發現只有 Val、Leu、Met、Tyr、Trp 這幾個胺基酸有產生產物  $\beta$ -amyrin，突變成其餘的胺基酸都沒有產物的產生，根據這個結果在和之前的序列比對結果我們可以發現一個十分巧合的現象，那就是序列比對中其它物種 CAS 和 OSC 的疏水性胺基酸 Leu 和 Met 也能有少量的  $\beta$ -amyrin 產生《表 3-4》，從實驗結果發現，只有特定大小的疏水性胺基酸以及芳香族的胺基酸才能產生，而跟 Phe 最相似的 Tyr 則有最多且接近 wide type 的  $\beta$ -amyrin 產生量

Ps_BAS	117	AENAGPLF <b>F</b> LPPLVMCLY	134
Oe_LUP	116	AESAGPLF <b>F</b> LPPLVLALY	133
At_CAS	116	GDYGGPLF <b>L</b> LPALVIGLY	133
At_LAS	116	GDYGGPMF <b>L</b> LPGLIITLS	133
Hs_OSC	96	GDYGGPLF <b>L</b> LPGLLITCH	113
Sc_OSC	97	CQYKGPMF <b>M</b> TIGYVAVNY	114

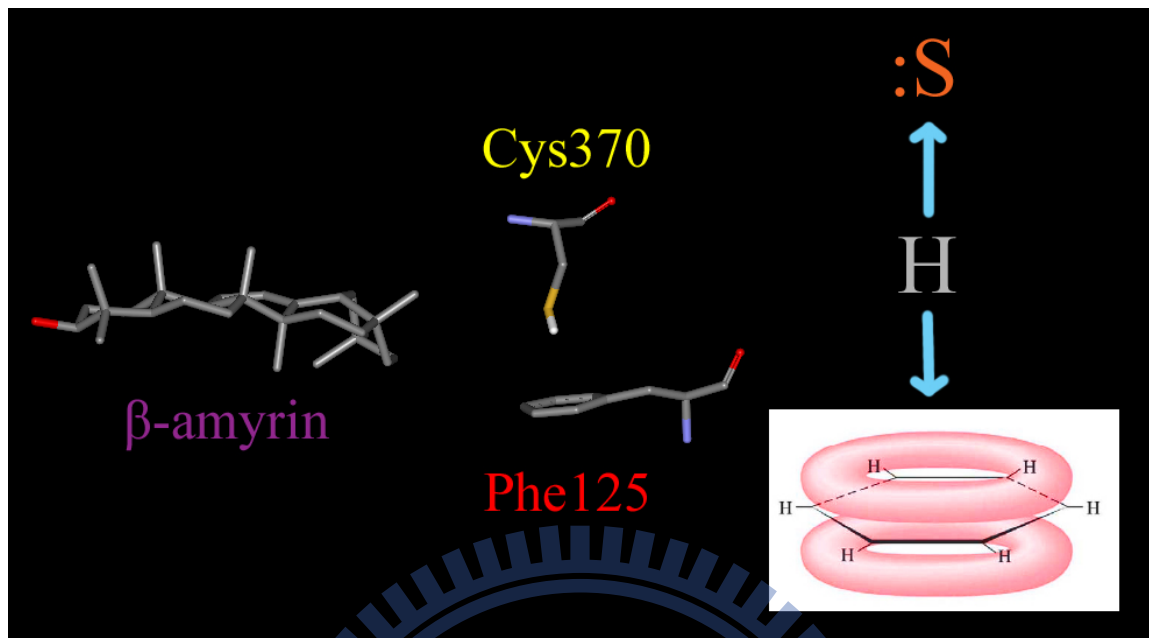
《表 3-4》不同物種間位於 PSY<sup>F125</sup> 位置胺基酸的序列比對

根據這個實驗結果，從 PSY 的結構模擬中可以窺得一二，從結構中我們找出 F125 (圖中粉紅色的胺基酸) 周圍所有接近的胺基酸 (以綠色標示)，因為接近受質所以其中大部分為疏水性基團，所以在這個時候擁有特定大小的疏水性胺基酸也就對於周圍結構有著十分大的影響，而其中特別值得注意的就是 Cys370(以橘色標示)，它的側鏈跟 F125 的苯

環位置呈現著接近 90 度的角度，為什麼能使其固定在這個位置，推測是尾端的氫原子（圖中 Cys370 尾端白色部分）夾在 Cys370 硫原子上孤對電子和 F125 中苯環的  $\pi$  電子雲兩者吸引力拉扯的作用之下產生的結果，而這對於尾端結構上扮演著十分重要的腳色，這點在下段會進行說明《圖 3-6》《圖 3-7》。



《圖3-6》 F125周圍的胺基酸以及和F125的距離



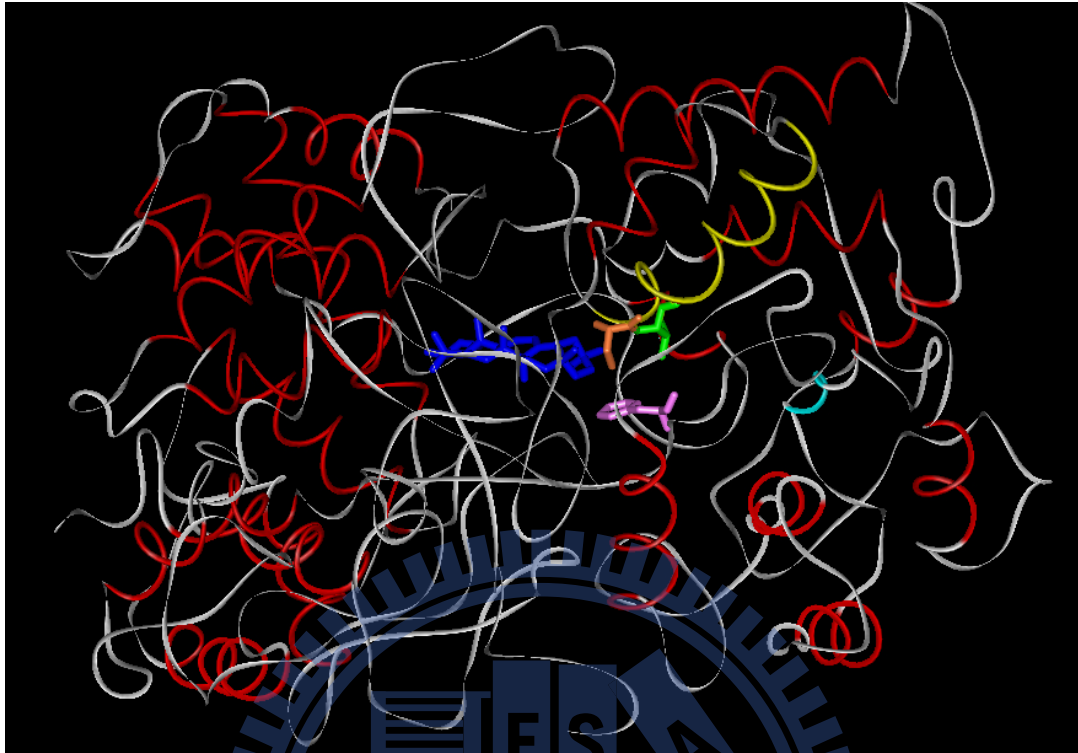
《圖3-7》F125中苯環的 $\pi$ 電子雲與Cys370上的硫原子拉扯兩者中間之  
 氫原子的相互作用力

接下來我們把注意力集中在觀察整個PSY 酵素的整體結構，也就是其中 $\alpha$ -helix 或是 $\beta$ -sheet 結構的存在與分佈，發現若以受質為中心的話，在整個酵素的左半部以及後半部的上方發現許多 $\alpha$ -helix 的結構，而其中Cys 370 和 Val 371 正是圖中尾部其中一個 $\alpha$ -helix(圖中以黃色標示)的起始兩個胺基酸《圖 3-8》，當這兩個胺基酸位置改變的時候將有可能也改變酵素後半部的結構，當結構改變的時候可能導致受質的結合胺基酸位置改變，使得受質無法在正確的位置，也可能使得位於尾部的受質進出入口有封閉，這點符合先前發表的人類 OSC 結晶結構中認為受質在尾

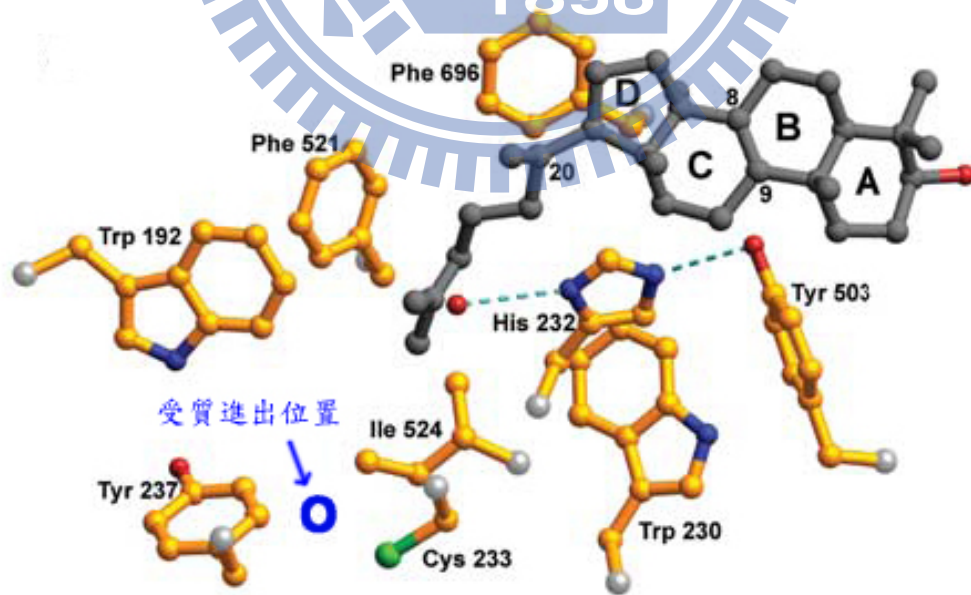


部進出的推論《圖 3-9》；因此要使得 Cys 370 和 Val 371 在正確的位置上，F125 也就顯得十分的重要，藉由苯環上的  $\pi$  電子雲與 Cys370 之間的相互作用來達到位置的正確，這也就說明了為什麼只有擁有苯環的 Tyr 能產生如同正常量的  $\beta$ -amyrin，因為 Tyr 在相同位置上也可以有著苯環上的  $\pi$  電子雲與 Cys370 之間的相互作用力，使得尾部有正確的結構結構，而其餘的則是一些特定大小的疏水性胺基酸的 Val、Leu、Met 或是擁有較大的芳香基團 Trp 能產生小量的  $\beta$ -amyrin，是因為雖然其大小和疏水性能達到空間分佈的要求，但是這幾個胺基酸和 Cys370 之間，沒有辦法產生如同 F125 中苯環的  $\pi$  電子雲與 Cys370 上的硫原子拉扯兩者中間之氫原子的相互作用力，用以將尾端這個  $\alpha$ -helix 固定在正確的位置上，所以在酵素動力學上是有影響的，使產物產量大幅的降低。

總結來說 Phe125 在酵素 BSA 所扮演的腳色就是利用和周圍胺基酸的交互作用來穩定酵素尾端的結構，並且使得得受質能順利進出。



《圖3-8》PSY結構圖，藍色為受質，橘色為C370，綠色為V371，黃色為包含C370和V371的 $\alpha$ -helix



《圖3-9》人類OSC結晶結構推測受質進出位置(藍色圓圈部分)

## 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<sup>M105F+H234G/A/Y</sup>、ERG7<sup>M105X</sup> 與 PSY<sup>F125x</sup>。建構 ERG7<sup>M105F+H234G/A/Y</sup> 是期望能有繼續環化的新產物產生，ERG7<sup>M105X</sup> 則是研究此點胺基酸的真正功用以及討論雙點突變的結果，而在相對應的 PSY<sup>F125X</sup> 則發現此點的胺基酸功能性完全不同於酵母菌 ERG7<sup>M105</sup>。

### 4.1 酵母菌 ERG7<sup>M105F+H234G/A/Y</sup> 功能性分析

在酵母菌 ERG7<sup>M105F+H234G/A/Y</sup> 的功能性篩選中，除了 M105F+H234G 另外兩個突變點都使酵素失去了活性。

在 M105F+H234G 產生了少量的 LA，而 M105F+H234A/Y 則沒有產物的產生，比對 M105F 單點突變也是只有少量的 LA 產生，其結果應是突變成 Phe 這個較大的胺基酸造成酵素後端結構不穩，故只能產生少量的 LA，雙突變實驗亦是如此。

## 4.2 酵母菌 ERG7<sup>M105X</sup> 功能性分析

在酵母菌 ERG7<sup>M105X</sup> 的功能性篩選中，除了幾個較大的胺基酸 Arg、Tyr、Trp 使得酵素失去活性沒有產物產生之外，其餘皆能產生 LA。

在突變成較小的胺基酸 Gly、Ala，親水性以及帶電的胺基酸 Ser、Asn、Gln、Lys 會造成重排反應中 C17 碳陽離子不穩定，而停留在 C20 的位置，最後形成 protosta-20,24-dien-3 $\beta$ -ol；過大的胺基酸 Arg、Phe、Tyr、Trp 會使得結構不穩而產生少量的 Achillol A、LA 或是沒有產物的產生。

根據結果可以發現，Met105 主要是藉由疏水性的側鏈來穩定 C17 碳陽離子，使得重排反應順利的進行，進而產生最終產物 LA。

## 4.3 *P.sativum* PSY<sup>F125X</sup> 功能性分析

只有在突變成 Val、Ile、Met、Tyr、Trp 時有產生  $\beta$ -amyrin，其餘皆沒有產物的產生，其中只有 Tyr 的產量接近 wild type，其餘皆只有小量的  $\beta$ -amyrin 產生。

根據結果可以得知，只有特定大小的疏水性胺基酸以及 Phe 同為芳香族的胺基酸可以產生  $\beta$ -amyrin，這是因為 Phe125 是藉由本身的疏水

性和受質周圍的疏水性胺基酸交互作用來穩定尾端的結構，特別是和 Cys370 的交互作用特別的顯著，藉由苯環上面  $\pi$  電子雲和胺基酸上面的硫原子拉扯兩者之間的 H 原子來達到固定胺基酸位置的作用，因為 Phe125 周圍這兩個 Cys370 和 Val371 是尾端一個  $\alpha$ -helix 結構的開始兩個胺基酸，所以其位置的正確影響著結構，因此只有特定大小的疏水性胺基酸能取代其部份功能，而苯環上  $\pi$  電子和胺基酸相互的作用力也和實驗結果中 Tyr 能產生接近 wild type 產量的  $\beta$ -amyrin 相互呼應。



## 第五章 未來展望

將繼續利用國家高速網路中心，以 BAS 進行突變電腦模擬圖的建構，並利用建構的結果，希望能找出其中可能活性區域，特別是 D 環上的擴環以及 E 環的環化反應，並進行相關突變的實驗，進而研究出氧化鯊烯環化酵素 OSC 和 BAS 中的差異關鍵胺基酸為何。

目前正在努力建構 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，這樣可以使得產物的比例也更為精準，因為避免了下游酵素的影響讓，希望能藉此獲得更多詳細的資訊。

另外一個方面則是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即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，這將使得氧化鯊烯環化酵素在結構、受質結合以及活性區域預測方面等有更進一步的了解。

## 第六章 參考文獻

- (1) Allayee, H.; Laffitte, B. A.; Lusic, A. J. *Science* **2000**, *290*, 1709-11.
- (2) Vance, D. E.; Van den Bosch, H. *Biochim Biophys Acta* **2000**, *1529*, 1-8.
- (3) Schulz-Gasch, T.; Stahl, M. *J Comput Chem* **2003**, *24*, 741-53.
- (4) Harvey, P. C. C. a. R. A. *Lippincotts Illustrated Review Biochemistry* **2001**, 173-185.
- (5) Simons, K.; Toomre, D. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2000**, *1*, 31-9.
- (6) Simons, K.; Eehalt, R. *J Clin Invest* **2002**, *110*, 597-603.
- (7) Quesney-Huneus, V.; Galick, H. A.; Siperstein, M. D.; Erickson, S. K.; Spencer, T. A.; Nelson, J. A. *J Biol Chem* **1983**, *258*, 378-85.
- (8) Quesney-Huneus, V.; Wiley, M. H.; Siperstein, M. D. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1979**, *76*, 5056-60.
- (9) Chugh, A.; Ray, A.; Gupta, J. B. *Prog Lipid Res* **2003**, *42*, 37-50.
- (10) Dougherty, D. A. *Science* **1996**, *271*, 163-8.
- (11) Grundy, S. M. *N Engl J Med* **1988**, *319*, 24-33.
- (12) Dang, T.; Abe, I.; Zheng, Y. F.; Prestwich, G. D. *Chem Biol* **1999**, *6*, 333-41.
- (13) DiDomenico, B. *Curr. Opin Microbiol.* **1999**, *2*, 509-15.
- (14) Abe, I.; Zheng, Y. F.; Prestwich, G. D. *Biochemistry* **1998**, *37*, 5779-84.
- (15) Xu, R.; Fazio, G. C.; Matsuda, S. P. *Phytochemistry* **2004**, *65*, 261-91.
- (16) I. Abe, M. R., G. D. Prestwich *Chem. Rev* **1993**, *93*, 2189-2206.
- (17) Robinson, H. S. *J Natl Med Assoc* **1970**, *62*, 474-7.
- (18) Barton, D. H.; Day, M. J.; Hesse, R. H.; Pechet, M. M. *J Chem Soc Perkin I* **1975**, 2252-6.
- (19) E. J. Corey, S. C. V. *J. Am. Chem. SOC.* **1991**, *113*, 4025-4026.
- (20) Barton, P. G.; Gunstone, F. D. *J Biol Chem* **1975**, *250*, 4470-6.
- (21) B. robustell, I. A., G. D. prestwich *tetrahedron letters* **1998**, *39*, 957-960.
- (22) E. J. Corey, D. D. S. *J. Am. Chem. Soc* **1998**, *120*, 3526-3530.
- (23) E. J. Corey, H. C., C. H. Baker, S. P. T. Matsuda, D. Li, X. Song *JAm. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 1277-1288.
- (24) E. J. Corey, C. H. B. H. C., S. P. T. Matsuda, D. Li, X. Song *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 1289-1298.
- (25) J. A. Zoltewicz, N. M. M. *J. Org.Chem* **1998**, *63*, 4985-4990.
- (26) P. C. Miklis, R. D., T. A. Spencer *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 10482-10489.

- (27) Gallivan, J. P.; Dougherty, D. A. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1999**, *96*, 9459-64.
- (28) Wendt, K. U.; Poralla, K.; Schulz, G. E. *Science* **1997**, *277*, 1811-5.
- (29) Reinert, D. J.; Balliano, G.; Schulz, G. E. *Chem Biol* **2004**, *11*, 121-6.
- (30) Abe, I. *Nat. Prod. Rep.* **2007**, 1-21.
- (31) Wendt, K. U.; Schulz, G. E.; Corey, E. J.; Liu, D. R. *Angew Chem Int Ed Engl* **2000**, *39*, 2812-2833.
- (32) Wendt, K. U.; Lenhart, A.; Schulz, G. E. *J Mol Biol* **1999**, *286*, 175-87.
- (33) T. Merkofer, C. P.-G., K. U. Wendt, M. Rohmer, K. Poralla *Tetra. Lett.* **1999**, *40*, 2121-2124.
- (34) Hoshino, T.; Sato, T. *Chem. Commun.* **2002**, 291-301.
- (35) W. S. Johnson, S. D. L., J. Steele *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 5852-5853.
- (36) W. S. Johnson, S. J. T., S. Cheng, U. Schubert *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 2517-2518.
- (37) Griffin, R. J.; Stevens, M. F. *Anticancer Drug Des* **1992**, *7*, 443-9.
- (38) Thoma, R.; Schulz-Gasch, T.; D'Arcy, B.; Benz, J.; Aebi, J.; Dehmlow, H.; Hennig, M.; Stihle, M.; Ruf, A. *Nature* **2004**, *432*, 118-22.
- (39) Abe, I.; Bai, M.; Xiao, X. Y.; Prestwich, G. D. *Biochem Biophys Res Commun* **1992**, *187*, 32-8.
- (40) Van Tamelen, E. E.; Willet, J.; Schwartz, M.; Nadeau, R. *J Am Chem Soc* **1966**, *88*, 5937-8.
- (41) Segura, M. J.; Jackson, B. E.; Matsuda, S. P. *Nat Prod Rep* **2003**, *20*, 304-17.
- (42) Wendt, K. U. *Angew Chem Int Ed Engl* **2005**, *44*, 3966-71.
- (43) C. Jenson, W. L. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 10846-10854.
- (44) Hess, B. A., Jr. *Org Lett* **2003**, *5*, 165-7.
- (45) Hess, B. A., Jr. *J Am Chem Soc* **2002**, *124*, 10286-7.
- (46) D. Gao, Y.-K. P., K. Byun, J. Gao *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 4045-4046.
- (47) Joubert, B. M.; Hua, L.; Matsuda, S. P. *Org Lett* **2000**, *2*, 339-41.
- (48) Wu, T. K.; Liu, Y. T.; Chiu, F. H.; Chang, C. H. *Org Lett* **2006**, *8*, 4691-4.
- (49) Sato T, H. T., Abe T. *Chem. Commun Chem. Commun.* **1998**, 2617-2618.
- (50) Abe, I. *Nat Prod Rep* **2007**, *24*, 1311-31.
- (51) T. K. Wu, Y. T. L., C. H. Chang, M. T. Yu, H. J. Wang *J. Am. Chem. Soc* **2005**, *128*, 6414-6419.
- (52) Wu, T. K.; Liu, Y. T.; Chang, C. H. *ChemBiochem* **2005**, *6*, 1177-81.
- (53) Wu, T. K.; Chang, C. H. *ChemBiochem* **2004**, *5*, 1712-5.
- (54) Lodeiro, S.; Wilson, W. K.; Shan, H.; Matsuda, S. P. *Org Lett* **2006**, *8*, 439-42.
- (55) Wu, T. K.; Yu, M. T.; Liu, Y. T.; Chang, C. H.; Wang, H. J.; Diao, E. W. *Org Lett* **2006**, *8*, 1319-22.



- (56) W. K. W. Jennifer B. R. Herrera, a. S. P. T. M. *J. Am. Chem. Soc* **2000**, *122*, 6765-6766.
- (57) Lodeiro, S.; Segura, M. J.; Stahl, M.; Schulz-Gasch, T.; Matsuda, S. P. *Chembiochem* **2004**, *5*, 1581-5.
- (58) J. B. R. Herrera, W. K. W., S. P. T. Matsuda *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 765-6766.
- (59) Lodeiro, S.; Schulz-Gasch, T.; Matsuda, S. P. *J Am Chem Soc* **2005**, *127*, 14132-3.
- (60) 謝文祥, 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. 碩士論文, 國立交通大學生物科技研究所 **2008**.
- (61) 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**.
- (62) 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**.

