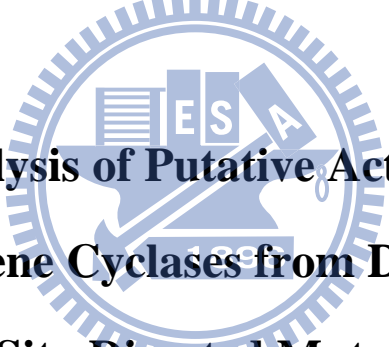


國立交通大學

生物科技研究所 碩士論文

利用定點突變研究不同物種之
氧化鯊烯環化酵素假設活性區內氨基酸之角色



**Functional Analysis of Putative Active Site Residues in
Oxidosqualene Cyclases from Different Species
by Site-Directed Mutagenesis**

研究生：呂靜婷

指導教授：吳東昆 博士

中華民國 九十九年七月

利用定點突變研究不同物種之
氧化鯊烯環化酵素假設活性區內氨基酸之角色

**Functional Analysis of Putative Active Site Residues in
Oxidosqualene Cyclases from Different Specie
by Site-Directed Mutagenesis**

研究生：呂靜婷

Student: Ching-Ting Lu

指導教授：吳東昆 博士

Advisor: Dr. Tung-Kung Wu



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, 2010
Hsinchu, Taiwan, Republic of China

中華民國九十九年七月

利用定點突變研究不同物種之 氧化鯊烯環化酵素假設活性區內氨基酸之角色

學生: 呂靜婷

指導教授: 吳東昆 博士

國立交通大學 生物科技研究所碩士班

摘要

氧化鯊烯環化酵素的催化機制在近半世紀以來，是生物化學及化學家公認最迷人且最具挑戰性的生化反應之一。直鏈狀的氧化鯊烯在不同物種的氧化鯊烯環化酵素內，經過單一步驟的酵素催化反應後，生成近二百種具有物種特異性的四至六環的三萜類化合物。為了探討同源的氧化鯊烯環化酵素如何在演化的過程中，藉由改變其活性位置的氨基酸結構以產生具有不同物種專一性之產物，我們利用丙氨酸掃描法，探討豌豆中香桂素合成酵素和阿拉伯芥中環阿屯醇酵素的假設活性區氨基酸其參與在酵素的結構與活性關係。並且，針對酵母菌氧化鯊烯環化酵素活性區域中 Cys457 進行飽和定點突變，進行功能性的全面分析。

在豌豆香桂素合成酵素中，我們發現 PSY^{Y259A} 與 PSY^{G369A} 單定點突變株會造成酵素失去其原本的活性；而在阿拉伯芥環阿屯醇酵素中，有五個定點突變株 CAS^{Y118A}、CAS^{L124A}、CAS^{W221A}、CAS^{M254A} 和 CAS^{P367A} 會導致酵素失去原本活性，而 CAS^{H257A} 則是改變在環化最終步驟的脫氫反應，進而生成帕克醇。這些影響酵素活性的氨基酸突變，對於鄰近的氨基酸都具有一定程度的影響，而導致環化機制的失常。此外，利用不同載體表現 PSY^{Y259H} 並分析其突變株產物結果發現，若欲以酵母菌表現其他物種基因，需以具有高表現量特質之載體攜帶較佳。

在酵母菌 ERG7 飽和定點突變中，巨大的立體障礙(如 Phe、Tyr 與 Trp

等氨基酸取代)與電荷影響(如 His、Lys、Arg 和 Asp 等取代)都可能使酵素失去原本活性。此外,殘基過小的 Gly 取代也會影響酵素與受質的穩定性,改變產物分布,使單環的 Achilleol A 成為其主要產物。實驗結果顯示,Cys457 對於受質的開環反應有直接相關的影響,此外也會利用氨基酸殘基的立體障礙穩定環化機制的反應。



Functional Analysis of Putative Active Site Residues in Oxidosqualene Cyclases from Different Species by Site-Directed Mutagenesis

Student: Ching-Ting Lu

Advisor: Dr. Tung-Kung Wu

Institute of National Chiao Tung University

Abstract

The enzymatic cyclization of oxidosqualene is one of the most remarkable steps in the biosynthesis of steroids and triterpenoids. Oxidosqualene cyclases catalyze the biotransformation of the linear form substrate, oxidosqualene, into nearly 200 skeletally diverse triterpene compounds. In order to investigate the evolutionary divergence for the production of species-dependent products from individual oxidosqualene cyclases-mediated cyclizations via changing their critical active site environments, the alanine-scanning mutagenesis on plant *P. sativum* β AS and *A. thaliana* CAS were carried out, respectively, to study the relationship between functional residues substitutions and the respective enzymatic activity. Moreover, site-saturated mutagenesis experiments on Cys457 of *S. cerevisiae* ERG7 were carried out to clarify functional role of Cys457.

From the observation of mutagenic effect on either plant *P. sativum* β AS and *A. thaliana* CAS, PSY^{Y259A} and PSY^{G369A} caused a dramatic disruption of

catalytic function in β AS cyclization reaction. Moreover, CAS^{Y118A}、CAS^{L124A}、CAS^{W221A}、CAS^{M254A}、CAS^{H257A} and CAS^{P367A} mutations also lost their original function. Among them, CAS^{H257A} mutation changed the deprotonation site and resulted in the production of parkeol. The homology model revealed that the position of aromatic amino acid in active site was affected by these mutations. Besides, the analysis result of NSL extraction of PSY^{Y259H} mutant with a galactose-inducible vector, pYES2, exhibited a distinct product profiles from that of original pRS314 vector, suggesting that pYES2 vector is a suitable plasmid for analysis of plant oxidosqualene cyclase.

In parallel, the site-saturated mutations on Cys457 position of *S. cerevisiae* ERG7 showed that most of the substitutions successfully complemented the cyclase activity in a yeast ERG7 deficient strain, TKW14c2, except for the aromatic side chain substituted mutations (Phe、Tyr and Trp) and electronically charged side chain substitutions (His、Lys、Arg and Asp). Conversely, the residue of Gly substitution is too small to stabilize the cyclization reaction and leads to a monocyclic achilleol A formation. The homology modeling study suggested that the functional role of Cys457 might affect Asp456 to initiate the epoxide ring opening as well as to stabilize the following A-ring cyclization.

謝 誌

轉眼間，即將告別兩年的碩士生活，在這兩年裡有歡笑也有淚水，對於一路陪伴的老師、學長姐、同學以及學弟妹們在此要獻上我最深的感謝及祝福。

感謝吳東昆老師，謝謝老師讓我加入這溫馨的大家庭，並且不時的給予實驗上以及做人處世上的教導以及照顧，謝謝老師對於整個實驗室投入，讓我們擁有比別人更多更多的資源和儀器，即使在經費拮据的情況下，老師仍希望我們能無後顧之憂的進行實驗，千言萬語還是化作一句——老師，謝謝您！

感謝口試委員李耀坤老師和楊裕雄老師在百忙之中抽空審閱修改我的論文、親臨指導口試，並且不吝惜的給予許多寶貴的建議，使我收穫良多。

感謝實驗室永遠的燈塔—翔哥，謝謝你在最後的一個月幫我再三的修改論文；感謝媛婷學姐兩年來耐心的教導和鼓勵，你每一次的鼓勵都讓徬徨的我生出無比信心；感謝裕國學長在貧乏的實驗生活中，帶來許多非人類的的朋友；感謝豪哥一直默默的維護著實驗室的電腦儀器，在你離開博愛校區的實驗室後才發現你有多重要；感謝晉源學長在表現實驗上的教導，在那一個月內我見識到學長對於實驗認真的一面；感謝文鴻學長一直支持著我幻想的明星夢，甚至加入我的幻想世界；Thank you, Mili. I'll always miss your India food.；感謝小紅學姐在搬去光復居住後，仍辛苦奔波到博愛陪我吃早餐，趕上十點進實驗室的目標；感謝一直不斷發 paper 的 Allen 從不吝嗇與我們分享你的喜悅；感謝亦諄學姐和胡天昶對我實驗上和生活中的指導和幫助，雖然我都直呼胡天昶名諱，但我還是很尊敬你的，學長；感謝兩年來一直甘苦與共的同學，書涵、小花和奕齊有你們真好；感謝與我僅有 2 個月碩班同學緣分的小強不時回來探望，謝謝你分享不同實驗室的生活讓我更懂得珍惜；感謝學弟妹怡臻、欣怡、欣芳、世穎、新進學弟妹和專題生們，謝謝你們分擔了實驗室庶務也未帶來了歡樂。

還要感謝我親愛的家人：爸爸、媽媽還有姊姊，謝謝你們的支持，讓我可以依實無虞的念書，有你們我真的很幸福。

最後，祝福大家身體健康、一切順利、天天開心！！

目錄

中文摘要.....	I
英文摘要.....	III
謝誌.....	V
目錄.....	VI
表目錄.....	IX
圖目錄.....	X
第一章 前言.....	1
1.1 氧化鯊烯環化酵素簡介.....	1
1.2 氧化鯊烯酵素環化機制.....	5
1.2.1 受質的摺疊.....	6
1.2.2 環氧基開環和 A 環的形成.....	7
1.2.3 環化過程和受質穩定之假說.....	9
1.2.4 骨架重排與脫氫反應.....	15
1.3 (氧化)鯊烯環化酵素氨基酸序列比對.....	18
第二章 研究目的.....	23
第三章 實驗方法.....	25
3.1 重組質體的建構.....	26
3.2 酵母菌株 TKW14c2 的電穿孔作用.....	31
3.3 功能性補充活性篩選.....	32
3.4 酵母菌的培養.....	33
3.5 非皂化脂質的萃取.....	33

3.6	管柱液相色層分析.....	33
3.7	薄層色層分析.....	34
3.8	氣相層析-質譜儀 (GC-MS) 的條件.....	35
3.9	突變電腦模擬圖的建構.....	35
第四章	利用丙氨酸掃描法對豌豆和阿拉伯芥的 氧化鯊烯環化酵素假設活性區進行功能性分析.....	36
4.1	研究背景.....	36
4.2	丙氨酸掃描之結果與討論.....	41
4.2.1	建構假設活性區之定點突變株.....	41
4.2.2	定點突變株功能性補充篩選.....	43
4.2.3	<i>PsaPSY</i> 定點突變株產物分析.....	44
4.2.4	<i>PsaPSY</i> 突變株電腦模擬分析與結果討論.....	46
4.2.5	<i>AthCAS</i> 突變株結果分析與討論.....	50
第五章	利用飽和定點突變對酵母菌 $ERG7^{C457X}$ 進行功能性分析.....	53
5.1	研究背景.....	53
5.2	實驗結果與討論.....	56
5.2.1	建構酵母菌 $ERG7^{C457X}$ 定點飽和突變株.....	56
5.2.2	酵母菌 $ERG7^{C457X}$ 突變株功能性補充篩選.....	56
5.2.3	酵母菌 $ERG7^{C457X}$ 突變株產物分析.....	58
5.2.4	酵母菌 $ERG7^{C457X}$ 產物生成途徑推測.....	61
5.2.5.1	帶電荷氨基酸和芳香族氨基酸對開環的影響.....	64
5.2.5.2	$ERG7^{C457}$ 在環化過程所扮演的角色.....	66
第六章	結論.....	67

6.1 利用丙氨酸掃描針對 <i>PsaPSY</i> 和 <i>AthCAS</i> 假設活性區氨基酸的結果 分析.....	67
6.2 酵母菌 <i>ERG7^{C457}</i> 的功能性分析.....	68
第七章 未來展望.....	70
參考文獻.....	71
附錄一 利用桿狀病毒於昆蟲細胞中表現酵母菌氧化鯊烯-羊毛硬脂醇環化 酵素.....	74
附錄二 實驗藥品和儀器.....	79



表目錄

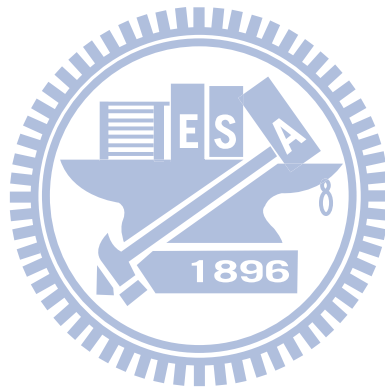
《表 1-1》阿拉伯芥中 CAS 定點突變產物及其比例分配表	17
《表 3-1》豌豆 PSY 假設活性區胺基酸定點突變之引子設計	27
《表 3-2》酵母菌 ERG7 ^{C457X} 飽和定點突變之引子設計	27
《表 3-3》QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit 之組成	28
《表 3-4》 <i>Dpn</i> I 酵素切除母股 DNA 產物之條件	29
《表 3-5》特定限制酶鑑定之材料條件	30
《表 3-6》BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit 所用之材料	30
《表 3-7》pRS314 PSY、pRS313 CAS 與 pRS314 ERG7 變質體定序引子 對照表	31
《表 3-8》因應不同載體所需之氨基酸添加表	32
《表 4-1》各物種間假設活性區之氨基酸比對	40
《表 4-2》 <i>Psa</i> PSY 之酵素鑑定	42
《表 4-3》 <i>Psa</i> PSY 假設活性區功能性篩選表	43
《表 4-4》丙氨酸掃描 <i>Psa</i> PSY 與 <i>Ath</i> CAS 假設活性區氨基酸之產物分 析表	44
《表 5-1》酵母菌 ERG7 ^{C457X} 功能性篩選	57
《表 5-2》酵母菌 ERG7 ^{C457X} 的產物分析表	59

圖目錄

《圖 1-1》 氧化鯊烯在真菌及動物中經 OSLC 環化成羊毛硬脂醇.....	1
《圖 1-2》 (氧化)鯊烯酵素家族在不同物種間的產物專一性與多樣性	2
《圖 1-3》 動物、真菌和植物體內固醇類的生合成步驟	3
《圖 1-4》 降膽固醇藥物: Lovastatin、Pravastatin、Fluvastatin 結構.....	4
《圖 1-5》 氧化鯊烯-羊毛硬脂醇環化酵素之環化機制	6
《圖 1-6》 氧化鯊烯在酵素內的摺疊方式與其產物	7
《圖 1-7》 酵母菌與人類氧化鯊烯-羊毛硬脂醇環化酵素之假設開環環化 機制	8
《圖 1-8》 鄰助作用幫助環氧基質子化開環	9
《圖 1-9》 環化形成 A 環速率大於 C2-C3 單鍵旋轉速率.....	9
《圖 1-10》 人類氧化鯊烯-羊毛硬脂醇環化酵素受質在 B 環的構形與穩定	10
《圖 1-11》 利用類似物作為受質結果顯示 C 環會先形成五圓環.....	11
《圖 1-12》 Hess 認為 C 環與 D 環會經由過渡態 10 同時形成.....	11
《圖 1-13》 氧化鯊烯酵素環化過程	錯誤! 尚未定義書籤。
《圖 1-14》 Johnson 提出的理論模型 Johnson Model.....	14
《圖 1-15》 Griffin 所提出的 Aromatic Hypothesis 理論模組	14
《圖 1-16》 氧化鯊烯環化酵素及其產物-羊毛硬脂醇形成複合物的結構圖	16
《圖 1-17》 CAS 與 ERG7 中氨基酸保留形式的差異	17
《圖 1-18》 各物中間 (氧化) 鯊烯環化酵素氨基酸序列比對結果	20
《圖 1-19》 不同物種間 (氧化) 鯊烯環化酵素內負責調控反應起始的胺 基酸序列	21
《圖 1-20》 Q-W Motif 在環化酵素家族內之分佈情形	21

《圖 3-1》實驗流程圖.....	25
《圖 3-2》QuikChange Site-Directed Mutagenesis 示意圖	26
《圖 3-3》 QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit 反應條件	28
《圖 3-4》 BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit 所用之溫度.....	30
《圖 4-1》 鯊烯-蛇麻烯環化酵素的環化機制.....	36
《圖 4-2》 <i>AacSHC</i> 之 X-ray 晶體結構圖與活性區氨基酸.....	38
《圖 4-3》 鯊烯-蛇麻烯環化酵素活性區域內假設活性氨基酸的位置與功能.....	39
《圖 4-4》 不同氧化鯊烯環化產物標準品之質譜與其結構對照圖	45
《圖 4-5》 野生型 <i>Psa PSY</i> 、 <i>Psa PSY</i> ^{G369A} 與 <i>Psa PSY</i> ^{Y259A} 結構模擬圖	47
《圖 4-6》 野生型 pRS314 ERG7 與 pRS314 PSY 經管柱層析後的 GC-MS 圖	48
《圖 4-7》 利用限制酶切接取得 pRS314 PSY ^{Y259H} 之方法	49
《圖 4-8》 野生型 <i>AthCAS</i> 十四個活性區氨基酸結構模擬圖	50
《圖 4-9》 阿拉伯芥 CAS ^{Y118A} 、CAS ^{L124A} 、CAS ^{W221A} 、CAS ^{M254A} 、CAS ^{P367A} 和 CAS ^{H257A} 等突變株分別與野生型 CAS 之空間結構比較.	52
《圖 5-1》 野生型和三定點突變株之鯊烯環化酵素環化受質與其產物.....	53
《圖 5-2》 人類氧化鯊烯-羊毛硬脂醇環化酵素 X-ray 晶體結構	54
《圖 5-3》 人類氧化鯊烯環化酵素 Cys456 和 Cys533 以氫鍵與 Asp455 連結	55
《圖 5-4》 酵母菌 ERG7 ^{C457X} 其產物質譜與其結構對照圖	60
《圖 5-5》 酵母菌 ERG7 ^{C457X} 產物生成路徑推測圖.....	62
《圖 5-6》 野生型酵母菌 ERG7 ^{C457} 與附近氨基酸結構模擬圖	63
《圖 5-7》 酵母菌突變株 ERG7 ^{C457W} 、ERG7 ^{C457R} 與其鄰近氨基酸結構模擬圖	64
《圖 5-8》 野生型酵母菌 ERG7 ^{C457} 和突變株 ERG7 ^{C457D} 、ERG7 ^{C457E} 與其	

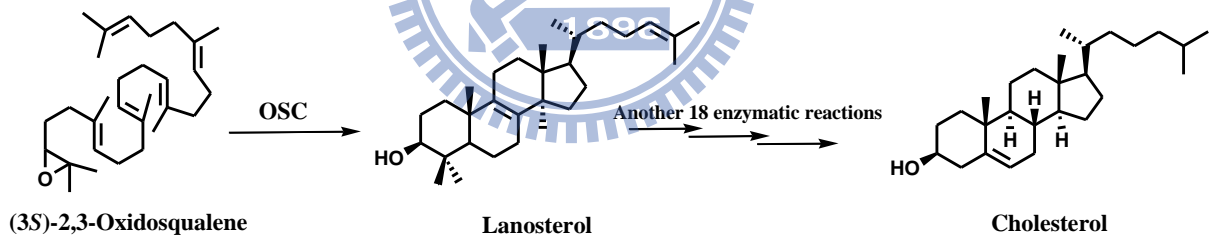
鄰近氨基酸結構模擬圖.....	65
《圖 5-9》酵母菌突變株 ERG7 ^{C457G} 與野生型 ERG7 之空間結構比較...	66
《附錄圖 1-1》pBacPAK8-MTeGFP ERG7 質體建構流程圖	75
《附錄圖 1-2》桿狀病毒感染昆蟲細胞之流程圖	76
《附錄圖 1-3》電泳分析之樣品備製	77
《附錄圖 1-4》酵母菌氧化鯊烯-羊毛硬脂醇環化酵素在 Sf9 細胞株的表現結果.....	78
《附錄圖 1-5》酵母菌氧化鯊烯-羊毛硬脂醇環化酵素在 High 5 細胞株的表現結果	78



第一章 前言

1.1 氧化鯊烯環化酵素簡介

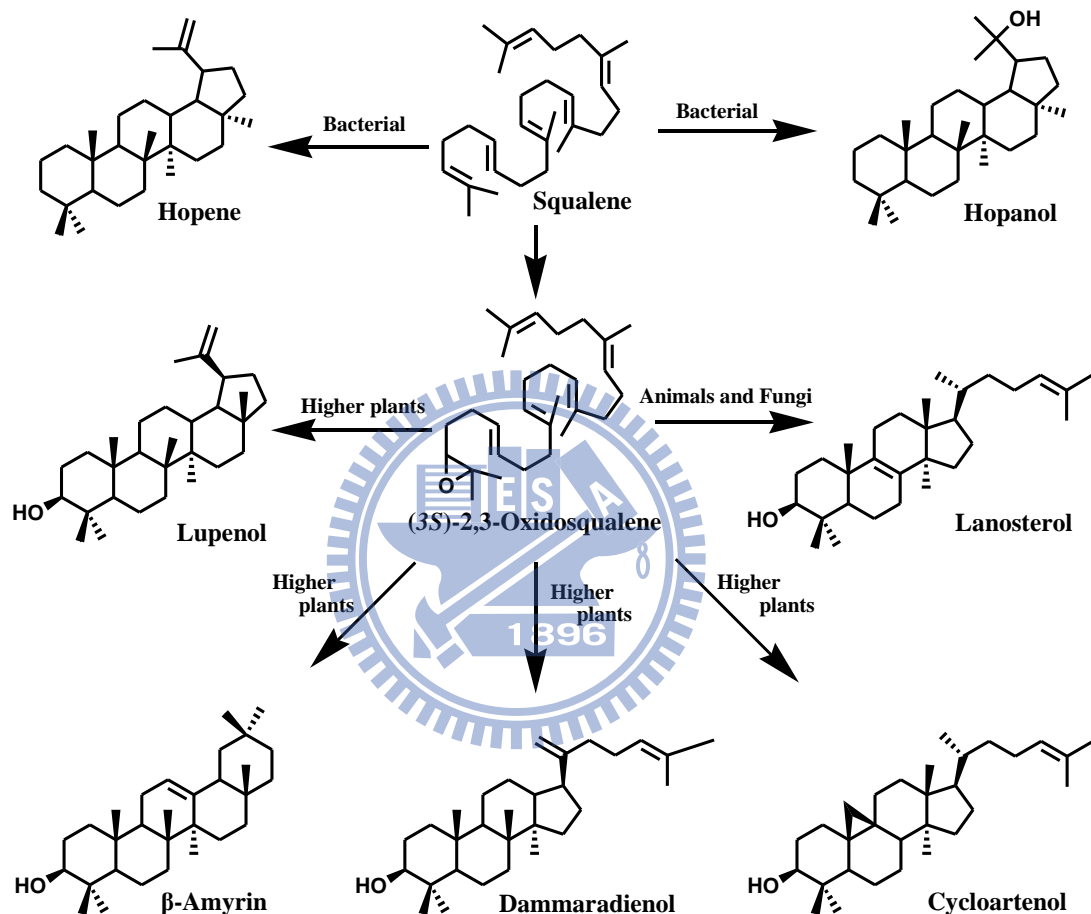
氧化鯊烯環化酵素家族以直鏈狀的氧化鯊烯 (oxidosqualene, OS) 為受質，經過單一步驟的酵素催化反應後，生成多種具有物種特異性的四至六環的三萜類化合物 (triterpenoid) 《圖1-1》。目前約有近 200 種氧化鯊烯環化酵素的產物被報導出來¹，這些產物的產生是經由類似的催化機制，因此都具有相似的骨架結構，但是由於在酵素活性區域與受質結合區的不同，導致其在環化骨架上有所差異，另外經由甲基與氫化基的重排反應後也會產生許多不同的碳陽離子中間產物，最後則依不同的碳陽離子的脫除步驟 (cation-quenching) 以終止反應，進而形成多樣的產物，這些環化產物亦可作為固醇類生合成的前驅物。



《圖 1-1》氧化鯊烯在真菌及動物中經氧化鯊烯環化酵素環化成羊毛硬脂醇

在高等植物中，氧化鯊烯可以被環阿屯醇合成酵素 (cycloartenol synthase, CAS) 環化進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)。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

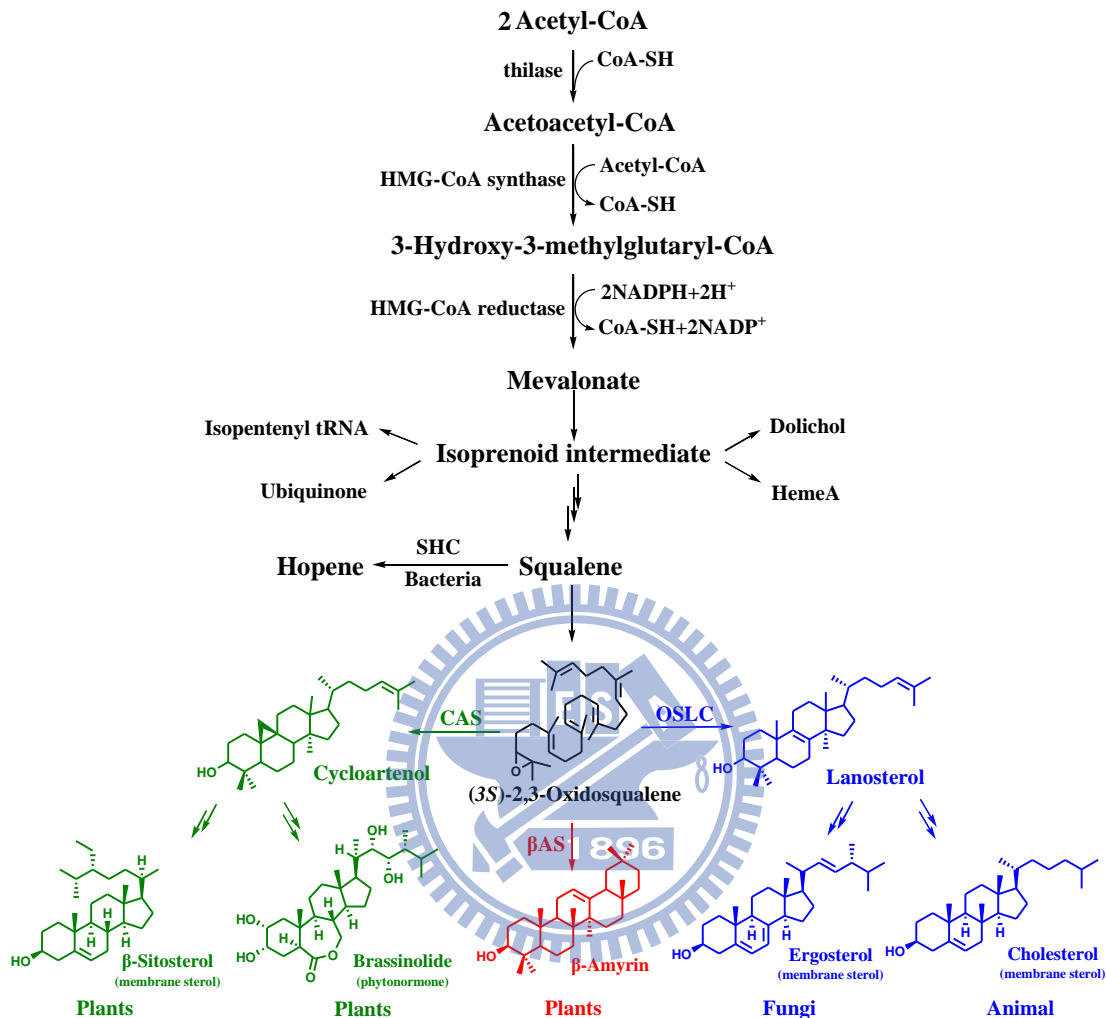
(oxidosqualene-lanosterol cyclase, OSLC) 則會將氧化鯊烯環化形成四環之羊毛硬脂醇 (lanosterol, LA) 《圖 1-2》。這些具有產物專一性的環化產物，可分別依反應產物骨架的複雜性進而區分為 6-6-6-5 四環、6-6-6-6-5 五環、6-6-6-6-6 五環或其他單環、雙環、三環與六環的三萜類化合物。



《圖 1-2》 (氧化)鯊烯酵素家族在不同物種間的產物專一性與多樣性

這些環化產物為固醇類合成的前驅物《圖1-3》。固醇類 (sterols) 是多環脂醇類物質的通稱，其組成通常是以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、植物與真菌中，例如：膽固醇 (cholesterol)、麥角固醇 (ergosterol)、植物固醇 (phytosterol)。

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²。

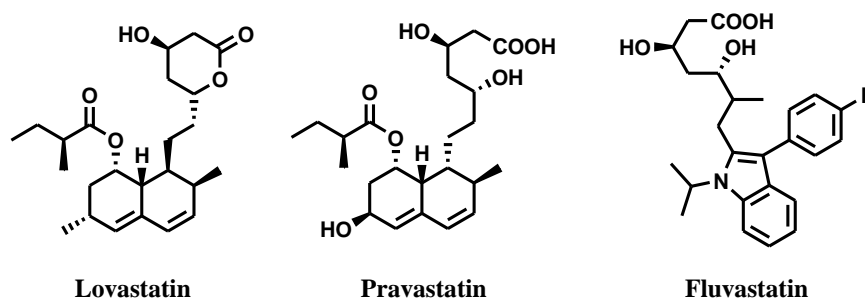


《圖 1-3》動物、真菌和植物體內固醇類的生合成步驟

在動物體內，最常見的固醇類物質以膽固醇（cholesterol）最為重要，其主要由肝臟製造產生，其次是在腎上腺皮質及動脈管壁上生成，同時也可經由食物攝取而獲得^{3,4}。由於膽固醇是細胞膜脂質筏（lipid raft）的組成成分—脂質筏是指細胞膜中的一塊固性區域，當其比例增加時，細胞膜的流動性就降低—因此可以藉此調控細胞膜的流動性，進而影響細胞膜內外物質的滲透⁴。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。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⁵。膽固醇也是膽汁、維生素D₃、紅血球與其它五種固醇類激素的重要前驅物。五種固醇類激素包括：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，而維生素D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。而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。

目前最常使用的降膽固醇藥物為施德丁 (statin) 類化合物，其為羥甲基戊二醯輔酶還原酵素 (HMG-CoA reductase) 的抑制劑《圖1-4》。羥甲基戊二醯輔酶位於固醇類生合成步驟的上游，在抑制固醇類的同時，也抑制其中游產物異戊二烯的生成，進而影響具有重要功能的二級代謝物的生成及調節。反觀氧化鯊烯環化酵素，其位於整個反應的中下游，若以此處作為研發抑制物的研究標的，對於身體的副作用理論上會相對降低，故近年來針對氧化鯊烯環化酵素進行抑制劑的合成，已成為研發降低膽固醇或是抗黴菌的新目標。

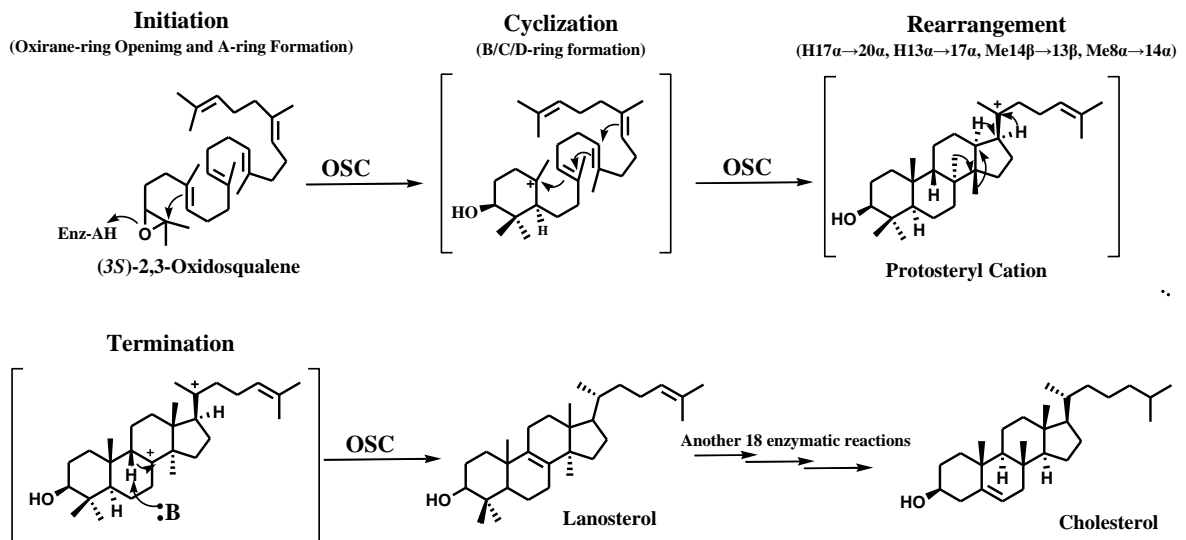


《圖 1-4》降膽固醇藥物：Lovastatin、Pravastatin、Fluvastatin 結構

1.2 氧化鯊烯酵素環化機制

除了環化產物的重要生理功能外，氧化鯊烯環化酵素的催化機制更是近半世紀以來，生物化學家及化學家公認最迷人且最具挑戰性的生化反應之一。隨著羊毛硬脂醇 (lanosterol) 的結構鑑定完成，Woodward 和 Bloch 等人推論其反應前驅物為鯊烯⁶。但 Corey 與 Bloch 證明在哺乳類中，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⁷。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^{8,9}。接下來，一系列以化學合成受質類似物(analog)或是抑制劑對於酵素所進行的研究，在酵素機制研究領域上，提供許多有利的證據。這些證據不只用來解釋受質結構的必需性，也可以說明受質在酵素活性區內的幾何構形。

目前，對於氧化鯊烯環化酵素催化機制的了解，包含了16個鍵的斷裂與生成，可分為下列幾個部分：(1) 受質與酵素間結合，並摺疊成適當構形；(2) 環化酵素中的酸性氨基酸提供質子，使得親核性的雙鍵(在鯊烯結構中)或是環氧基(在氧化鯊烯中)藉由其親核性作用而開環，並伴隨著鄰近雙鍵的斷裂，使得A環同時環化；(3) 具有立體選擇性的環化；(4) 甲基和氫化基(hydride)的重排重組反應，生成帶有正電荷的高能碳陽離子中間產物；(5) 最後，經由去質子化而形成雙鍵，或是藉由水分子的作用以提供氫氧基團形成雙醇類產物而終止反應《圖1-5》。

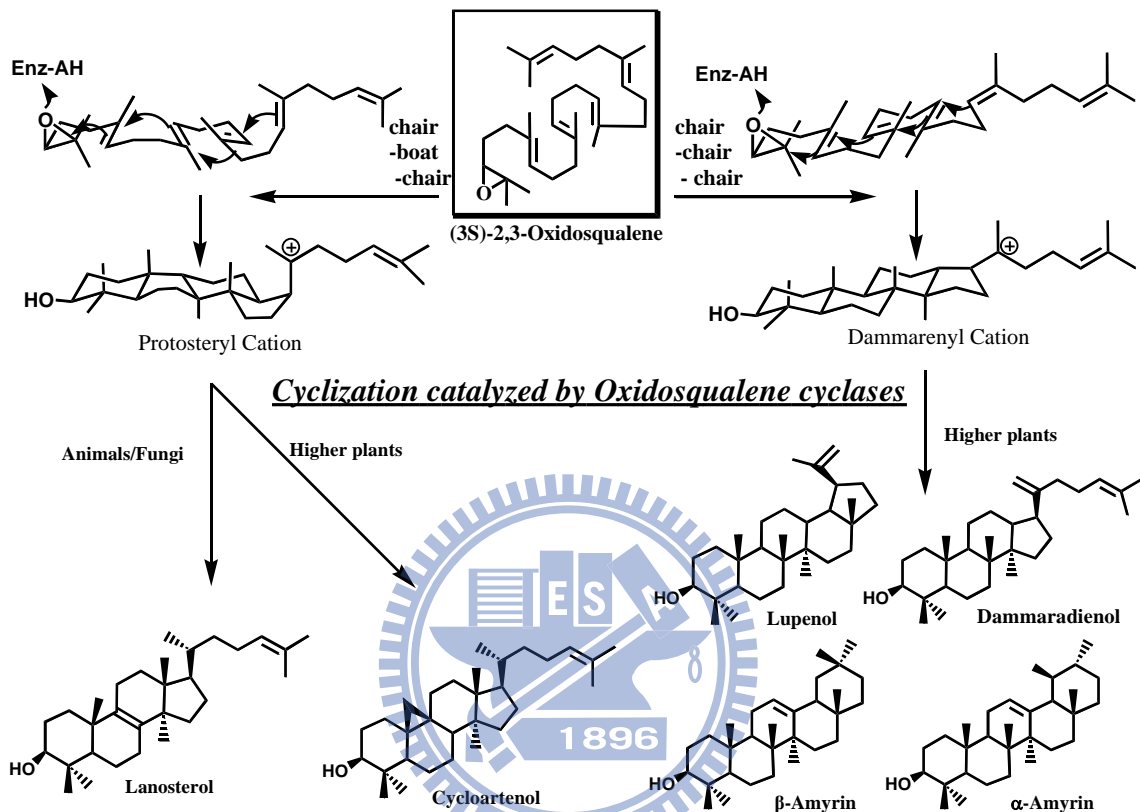


《圖 1-5》氧化鯊烯-羊毛硬脂醇環化酵素之環化機制

1.2.1 受質的摺疊

1970年，Robinson發現酵素必須將受質先折疊成環化產物結構的相似位置才可進行催化反應¹⁰。鯊烯在其環化酵素的活性區域中，皆依全椅形的形式（all-chairform）摺疊；而氧化鯊烯在不同物種的氧化鯊烯環化酵素活性區域中，經由環化酵素上氨基酸殘基的誘導，則會有兩種受質摺疊方式，其分別為椅形-船形-椅形（chair-boat-chair）與椅形-椅形-椅形（chair-chair-chair）。正因為摺疊方式的不同，而造成了立體構形相異的反應機制，再經質子化及一連串的雙鍵電子轉移後，會生成二種在 C-20 上帶有正電荷的中間產物：（1）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）；（2）經由 chair-chair-chair 骨架摺疊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，形成環阿屯醇、羊毛硬脂醇和南瓜子雙烯脂醇（cucurbitidienol）等產物；而達瑪烯碳陽離子中間物在不同酵素中則可以

被繼續誘導環化而形成 6-6-6-6-5 及 6-6-6-6-6 五環結構的碳陽離子中間物，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、 α -香桂素及 β -香桂素等《圖1-6》¹¹⁻¹³。

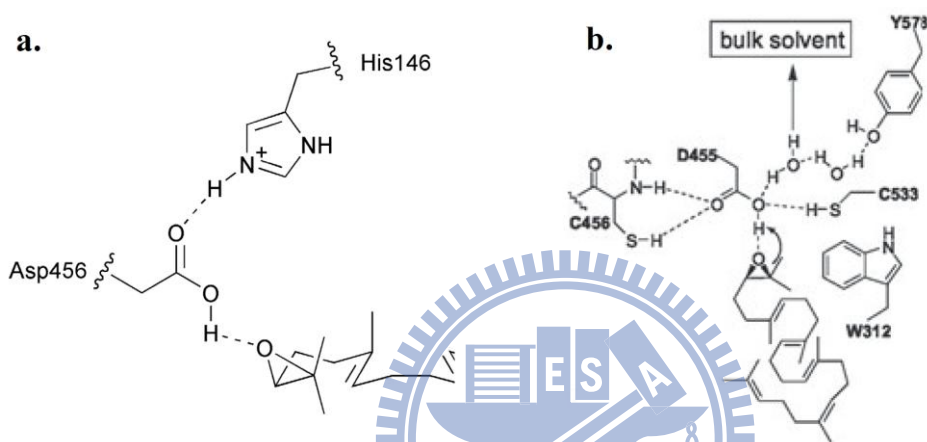


《圖 1-6》 氧化鯊烯在酵素內的摺疊方式與其產物

1.2.2 環氧基開環和 A 環的形成

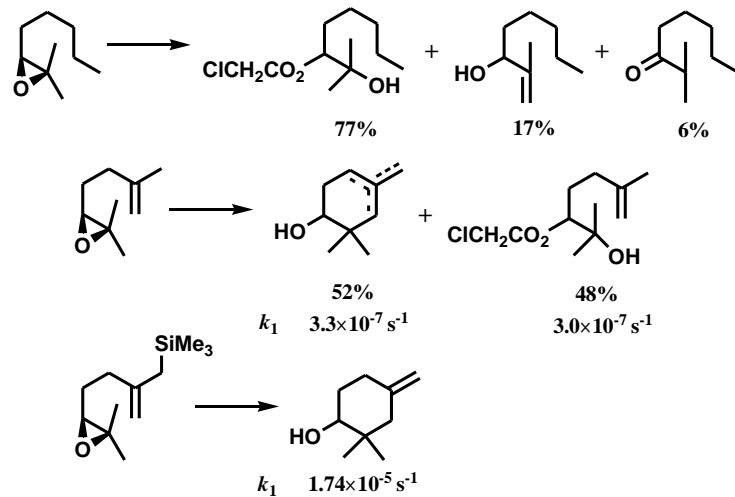
整個環化反應起始於親核性環氧基的活化開環。在先前的研究中指出，若將鯊烯置於中性或是弱酸的溶液中，在室溫下可穩定地存放一天，因此強酸被認為是促使環氧基活化開環所必需的¹⁴。1997 年，Corey 等人利用一系列的丙氨酸定點突變式掃描法 (Alanine scanning site-directed mutagenesis)，針對酵母菌中 ERG7 的活性區域內高度保留性的胺基酸進行實驗，實驗結果顯示酵母菌 ERG7 中的 His146、His234 與 Asp456 位置在催化機制上扮演十分重要的角色^{15,16}。這些研究認為 ERG7 在催化環氧基開環反應時，His146 會藉由氫鍵拉扯效應來增強 Asp456 的酸性，進

而提供質子促使環氧基質子化而開環《圖1-7a》¹⁷。同樣地，在人類氧化鯊烯-羊毛硬脂醇環化酵素的 X-ray 結晶結構上也發現，Cys456 和 Cys533 兩者皆以氫鍵與 Asp455 連結，可藉此增強 Asp455 的酸性，使其更容易釋出氫離子去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1-7b》¹⁸。

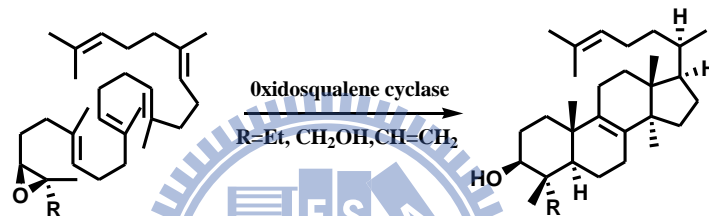


《圖 1-7》 a. 酵母菌 ERG7 假設開環環化機制¹⁷； b. 人類 OSLC 開環環化機制¹⁸

E. J. Corey 等人在 1997 年以化學反應證明，不具有鄰助作用 (anchimeric assistance) 的受質難以在化學反應中被質子化；而在具有鄰助作用的受質中，又以親核性較強的烯烴對於 C-O 斷裂的幫助較大《圖1-8》¹⁴。根據以上反應速率觀察結果推論，環化反應的起始不只需要有酸性基團在適當的位置提供質子，還需要受質在適當的摺疊方式下，使其環氧基上的 C-O 鍵的斷裂，並伴隨著鄰近 C-C 雙鍵的斷裂，同時形成 A 環。此外，以帶有 α -C2 甲基修飾的氧化鯊烯類似物為受質的實驗結果也發現，A 環形成的速率甚至比 C2-C3 單鍵旋轉速率還快《圖1-9》。近年來理論計算的結果也都認同在經由質子化開環反應後，會引起 A 環的環化形成，因此這兩個步驟到目前為止被認為是同步發生的^{14,19-21}。



《圖 1-8》鄰助作用幫助環氧基質子化開環¹⁴

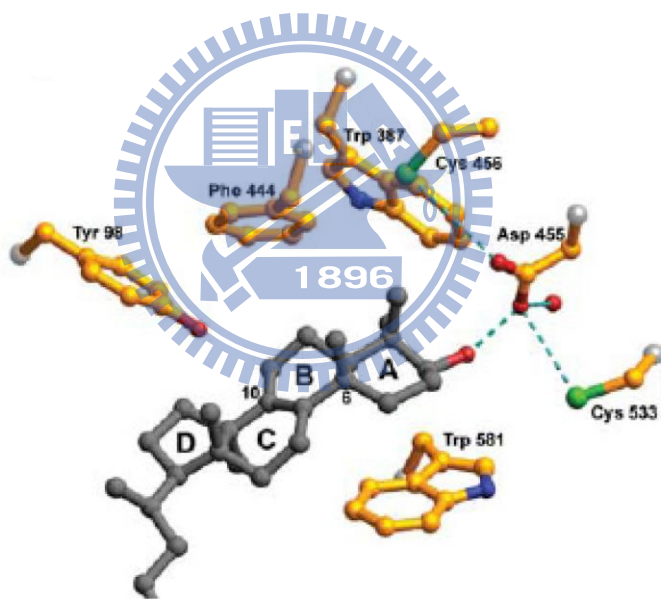


《圖 1-9》環化形成 A 環速率大於 C2-C3 單鍵旋轉速率

1.2.3 環化過程和受質穩定之假說

早期在環化機制尚不清楚時，Matsuda 等人在研究B環形成時發現，酵母菌 ERG7 內的氨基酸 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式將 Val454 突變成同為疏水性氨基酸的 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²²。在 2004 年所發表的人類 OSLC 結晶結構中，Thoma 等人指出幾個具有高度保留性的氨基酸位置，其中 Trp387、Phe444 與 Trp58 會利用其含有苯環的側鏈，並透過碳陽離子與 π 電子共振交互作用來穩定形成A環與B環時所產生的 C-6 和 C-10 的碳陽離子中間產物。然而，在酵母菌

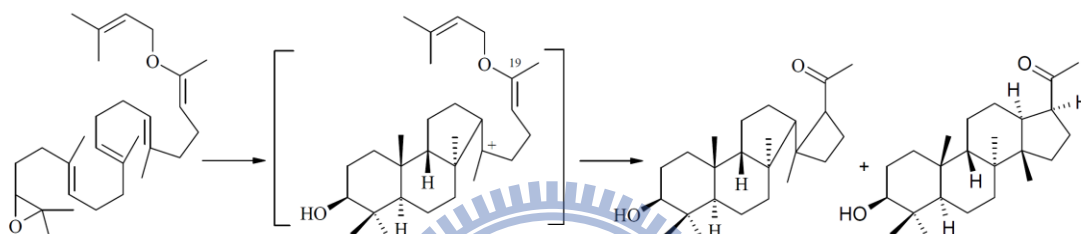
ERG7 的 Phe445 定點突變實驗裡，卻得到了一個 6-6-5 三環與三個在不同位置去質子化的 6-6-6-5 四環產物。這也證明了在酵母菌 ERG7 中，Phe445 會影響在C環形成時的 C-14 碳陽離子中間物與最後在 C-8/C-9 的去質子化步驟²³。另外，在B環形成時，針對能量較不傾向的船形結構方面，Thoma 認為 Tyr98 利用其立體空間較大的側鏈幫助推動氧化鯊烯 C-10 上的甲基到分子平面之下，而進一步地阻礙B環形成能量較傾向的椅形構形《圖1-10》²⁴。不過在酵母菌 ERG7 氨基酸 Tyr99 位置的飽和定點突變實驗結果中，Tyr99 已被證實其與 C-14 碳陽離子的穩定有關，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²⁵。



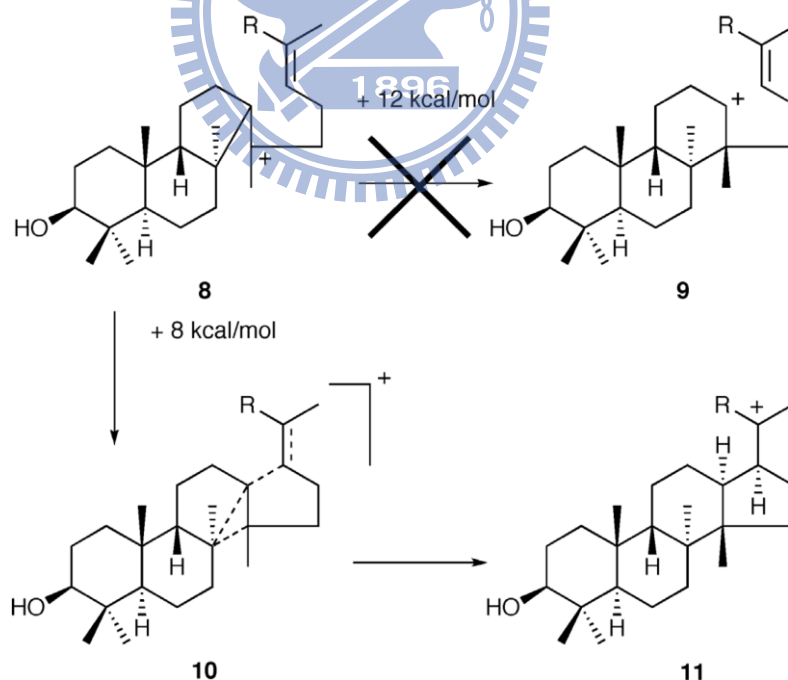
《圖 1-10》 Trp387、Phe444 與 Trp581 能穩定 A 環與 B 環形成時 C-6、C-10- 碳陽離中間物；Tyr98 的側鏈藉由立體空間障礙促使 B 環形成能量較不傾向的船形結構²⁴

另外在 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 1-11》^{26,27}。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²¹；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，之後 C 環的擴環與 D 環的環化得以同時發生，因此他們認為環化作用並不是像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 1-12》^{19,20}。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²⁸。



《圖 1-11》利用類似物作為受質結果顯示 C 環會先形成五圓環²⁷

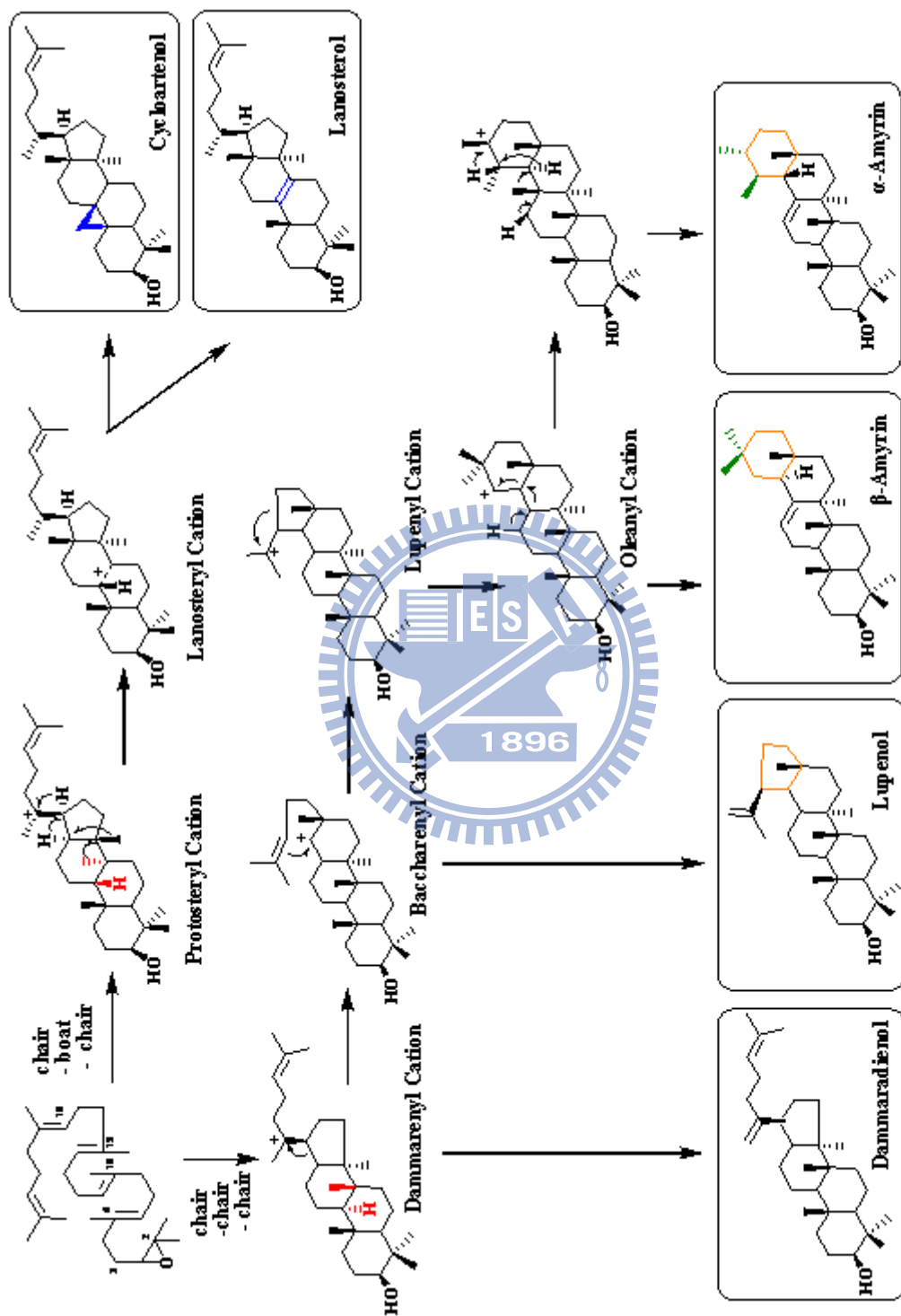


《圖 1-12》Hess 認為 C 環與 D 環會經由過渡態 10 同時形成²⁹

在人類 OSLC 的結晶結構中，His232 與 Phe696 被認為可以藉由其

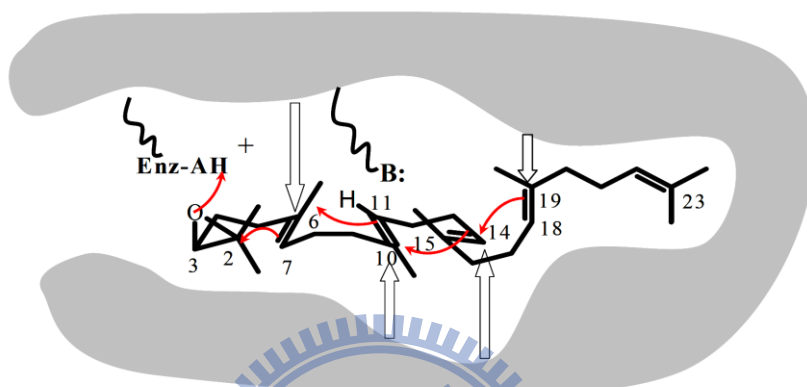
氨基酸側鏈上所富含 π 電子的特性，來穩定形成C環時依反-馬可尼可夫（anti-Markovnikov）法則所產生的二級碳陽離子，並且可以利用碳陽離子與 π 電子的共振作用來穩定帶有正電荷的高能 C-20 碳陽離子中間物。然而在酵母菌 ERG7 氨基酸 Phe699 位置的定點突變實驗中，除了三環產物外，還發現了在不同位置脫氫的產物，這結果顯示 Phe699 也會對 C-17 碳陽離子有所影響^{30,31}。在香桂素合成酵素中，環化五圓環D環所形成的達瑪烯碳陽離子中間物後，可經擴環作用產生 baccharenyl cation，甚至進一步環化形成E環；但在氧化鯊烯羊毛硬脂醇酵素和環阿屯醇酵素中，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，這是因為其缺少像鯊烯環化酵素中 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，而能更進一步的環化形成E環《圖1-13》。





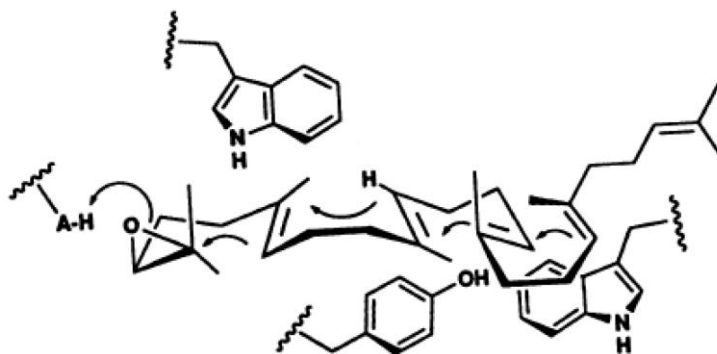
【圖1-13】氧化萜烯醇素環化過程

目前，有兩種假說解釋酵素如何穩定環化步驟中產生的許多高能量碳陽離子中間物。1987 年，Johnson 提出了第一個理論模型 (Johnson Model) 《圖 1-14》，在這個模型中 Johnson 認為酵素會利用其具相位選擇性 (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 1-14》Johnson 提出的理論模型 Johnson Model^{32,33}

另外，在 1992 年 Griffin 提出了另一個 Aromatic Hypothesis 理論模組³⁴《圖1-15》。由於在氧化蒎烯環化酵素中，具有芳香族基團的氨基酸 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其碳陽離子與 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。

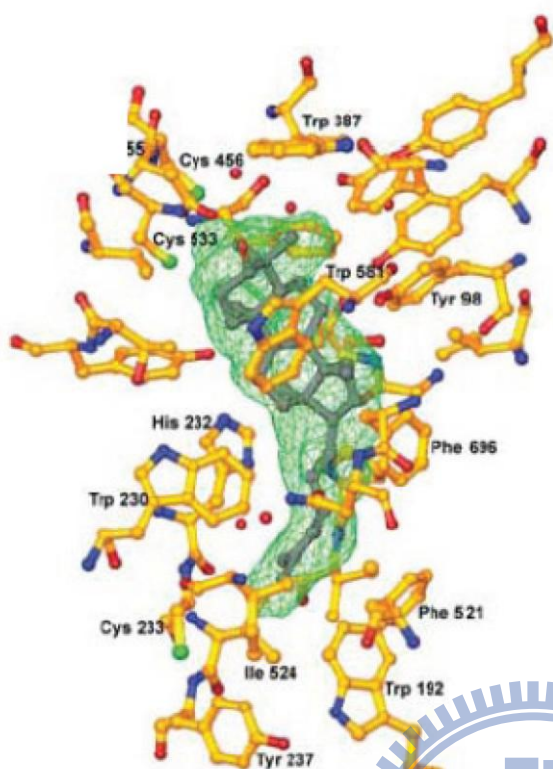


《圖 1-15》Griffin 所提出的 Aromatic Hypothesis 理論模組³⁴

1.2.4 骨架重排與脫氫反應

酵素活性區內的許多具有高度 π 電子性質的芳香族氨基酸，可以透過碳陽離子與其 π 電子的共振作用來穩定甲基與氫化基的轉移重排，以利最後的脫氫終止反應。整個骨架重排過程結束之後，在人類氧化鯊烯-羊毛硬脂醇環化酵素中具有高度保留性的氨基酸 His232（其對應到酵母菌 ERG7 為 His234），由於其鹼性殘基十分靠近 C-8/C-9 碳陽離子，所以被認為是最能夠接受質子，並進而終止整個環化機制的關鍵氨基酸位置。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，使得 His232 得以位於脫氫反應的最佳位置《圖1-16》²⁴。

此外，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氨基酸在活性區域內所具有的功能。在酵母菌 ERG7 中針對 His234 定點突變的產物分析上發現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^{35,36}。另外，在 Tyr510 突變成 Ala 的突變點中也發現了 parkeol^{37,38}。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，除了利用碳陽離子與 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^{35,36}。



《圖 1-16》氧化鯊烯環化酵素及其產物-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²⁴

環阿屯醇環化酵素和氧化鯊烯-羊毛硬脂醇環化酵素環化機制的差別，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。從熱力學的觀點來看，環阿屯醇比羊毛硬脂醇不穩定，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，可能是因為酵素裡某些特定胺基酸的影響而導致環阿屯醇的生成。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 在各物種的環阿屯醇環化酵素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》³⁹。將這些胺基酸進行定點突變實驗的結果證實，產生羊毛硬脂醇效率最好的突變株為雙定點突變株 *AthCAS1*^{H477N/I481V} 《表 1-1》⁴⁰。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基因 *At3g45130* 可以在植物中

合成羊毛硬脂醇，最後命名為 LAS (lanosterol synthesis)⁴¹。有趣的是從序列比對中可以發現，LAS 在相對應的 CAS 氨基酸 His477 與 I481 位置分別被換成 Asn 與 Val，這與上述 CAS 的雙定點突變實驗結果不謀而合，也顯示了這兩個氨基酸對於羊毛硬脂醇合成的重要性。



《圖 1-17》Tyr410(◆)、His477(*)與 Ile481(▼)在 CAS1 高度保留，而在 ERG7 中則被 Thr、Cys、Gln 或是 Val 所取代³⁹

《表1-1》阿拉伯芥中 CAS 定點突變產物及其比例分配表⁴⁰

<i>AthCAS1</i> mutants	Cycloartenol	Lanosterol	Parkeol	9B-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	-	-	-

1.3 (氧化)鯊烯環化酵素氨基酸序列比對

以生物演化的觀點來看，若在不同物種間皆保留相同之氨基酸序列，則此氨基酸可能對於酵素催化活性具備重要的功能且不可或缺；反之，較不重要的氨基酸則會隨物種的需要而產生變異或者根本被剷除掉，但這些差異極有可能是導致不同酵素間功能變異之關鍵。隨著研究的進行，有越來越多同源且功能相近的蛋白質氨基酸相繼被定序完成，為了從已知結果中探求進一步的資訊，因此我們採用 Clustal W 程式對於：*H. sapiens* ERG7: P48449、*S. cerevisiae* ERG7: P38604、*A. thaliana* CAS: NP_178722、*A. acidocaldarius* SHC: BAA25185 和 *P. sativum* β AS: BAA97558 進行氨基酸序列比對，藉此方法得知在不同物種間三萜類環化酵素彼此間的同源性 (identity) 及相似性 (homology)，因而得以再進一步的探討酵素在結構上與功能上的相關性。

<i>H. sapiens</i> ERG7	MTEGTCLRRRGGPYKTEPATDLG--RWRLN-CERGRQITWYTLQDER-----AGREQT 49
<i>S. cerevisiae</i> ERG7	MTEFYSDTIG-----LPKTDPR--LWRLRTDELGRESWEYLTPQQ-----AANDPP 44
<i>A. thaliana</i> CAS	MWKLKIAEGGS-PWLRITNNHVGRQFWEFDPNLGTPEDLAAVEEARKSFSNDRFVQKHS 59
<i>P. sativum</i> β AS	MWRLKIAEGGNDPYLFTNNFVGRQTWIYDPEAGSEEEERAQVEEARRNFYNNRFEVKPCG 60
<i>A. acidocaldarius</i> SHC	-----
<i>H. sapiens</i> ERG7	GLEAYALGLDTKNYFKDLPKAH-----TAFEGALN---GMTFYVGLQAED-GHWGTGDY 98
<i>S. cerevisiae</i> ERG7	STFTQWLLQDPK-FPQPHPERNKHSPDFSAFDACHN---GASFFKLLQEPDSGIFPCQY 99
<i>A. thaliana</i> CAS	DLLMRLQFSRENLI SPVLPOVKI EDTDDVTEEMVETTLKRGLDFYSTIQAHD-GHWPGDY 118
<i>P. sativum</i> β AS	DLLWRFQVLRENNFKQTI GGVKI EDEEEI TYEKTITTLRRGTHHLATLQTS D-GHWPAQI 119
<i>A. acidocaldarius</i> SHC	---MAEQLVEAPAYARTLDRV-----EYLLSCQKDE-GYWWGPL 36
<i>H. sapiens</i> ERG7	GGPLFLLPGLLITCHVAR---IPLPAGYREEIVRYLRSVQLP-DGGWGLHIEDKSTVFVGT 154
<i>S. cerevisiae</i> ERG7	KGPMFMTIGYVAVNYIAG---IEIPEHERIELIRYIVNTAHPVDGGWGLHSVDKSTVFVGT 156
<i>A. thaliana</i> CAS	GGPMFLLPGLIITLSITGALNTVLSEQHKQEMRRYLYNHQNE-DGGWGLHIEGPSTMFVGS 177
<i>P. sativum</i> β AS	AGPLFFMPPLVFCVYITGHLDVFPPEHRKEILRYIYCHQNE-DGGWGLHIEGHSTMFVCT 178
<i>A. acidocaldarius</i> SHC	LSNVTMEAEYVLLCHILDR---VDRDRMEKIRRYLLHEQRE-DGTWALYPGGPPDLDTT 91

<i>H. sapiens</i> ERG7	ALNYVSLRILGVGDDP---DLVRARNILHKKGGAVAIPSWGKFWLAVLNVYSWEGLNTL	211
<i>S. cerevisiae</i> ERG7	VLNYVILRLLGLPKDHP---VCAKARSTLLRLGGAI GSPHWGKI WLSALNLYKWEGVNPA	213
<i>A. thaliana</i> CAS	VLNYVTLRLLGEGPNDG-DGDMEKGRDWILNHGGATNITSWGKMWLSVLGAFEWSGNNPL	236
<i>P. sativum</i> β AS	ALNYICMRILGEGPDGGEDNACVRARNWIRQHGGVTHIPSWGKTWLSILGVFDWLGSNPM	238
<i>A. acidocaldarius</i> SHC	IEAYVALKYIGMSRDEE---PMQKALRFIQSQGGIESSRVFTRMWLALVGEYPPWEKVPMV	148
<i>H. sapiens</i> ERG7	FPEMWLFPDWAPAHPSLWCHCRQVYLPMSYCYAVRLSAAEDPLVQSLRQELYVEDFASI	271
<i>S. cerevisiae</i> ERG7	PPETWLLPYSLPMHPGRWWVHTRGVYIPVSYLSLVKFSCPMTPLLEELRNEYTKPFDKI	273
<i>A. thaliana</i> CAS	PPEIWLLPYFLPIHPGRMWCHCRMVYLPMSYLYGKRFVGPITSTVLSLRKELFTVPYHEV	296
<i>P. sativum</i> β AS	PPEFWILPSFLPMHPAKMWCYCRLVYMPMSYLYGKRFVGPITPLILQLREELHTEPYEKI	298
<i>A. acidocaldarius</i> SHC	PPEIMFLGKRMPLNIEYFGSWARATVVALSIVMSRQPVFPLPERARVP--ELYETDVPPR	206
<i>H. sapiens</i> ERG7	DWLAQRNNVAPDELYTPHSWLLRVVYALLNLYEHHHS-----AHLRQRAVQKLYEHIVA	325
<i>S. cerevisiae</i> ERG7	NFSKNRNTVCGVDLYYPHSTLNIANSLVVFEYKYL RN-----RFIYLSKKKVYDLIKT	328
<i>A. thaliana</i> CAS	NWNEARNLCAKEDLYYPHPLVQDILWASLHKIVEPVLMRWPG-ANLREKAIRTAIEHIHY	355
<i>P. sativum</i> β AS	NWTKTRHLCAKEDIYYPHPLIQDLTWDSLYIFTEPLLTRWPFNKLVRKRALEVTMKHIHY	358
<i>A. acidocaldarius</i> SHC	RRGAKGG-----GGWIFDALDRALHGYQKLSVHP-----FRRAAEIRALDWLLE	250
<i>H. sapiens</i> ERG7	DDRFTKSI SIGPI SKTINMLVRWYVDGPASTAFQEHVSRI PDYLWMLDGMKMQGTNGSQ	385
<i>S. cerevisiae</i> ERG7	ELQNTDSLCTAPVNAQFALVTLIEEGVDSEAFQRLQYRFKDALFHGPOGMITMGTINGVQ	388
<i>A. thaliana</i> CAS	EDENTRYICIGPVNKVNLMLCCWVED-PNSEAFKHLHLPRIHDFLWLAEDGMKMQGYNGSQ	414
<i>P. sativum</i> β AS	EDENSRYLTIGCVKVLMLACWVED-PNGDAFKKH IARVPDYLWISEDGMTMQSF-GSQ	416
<i>A. acidocaldarius</i> SHC	RQAGDGSWGGIQPPWFYALIALKILDMTQHPAFIKGWEGLELYGVELDYGGWFMQASISP	310
<i>H. sapiens</i> ERG7	IWDTAFAIQALLEAGGHRPEFSSCLQKAHEFLRLSQVP-DNPPDYQKYRQMRKGGFSF	444
<i>S. cerevisiae</i> ERG7	TWDCAFAIQYFFVAGLAERPEFYNTIVSAYKFLCHAQF--DTECVPGSYRDKRKGAWGF	445
<i>A. thaliana</i> CAS	LWDTGFATQAILATNLVE--EYGPVLEKAHSFVKNSQVLEDCPGDLNYWYRHSKGAWPF	472
<i>P. sativum</i> β AS	EWDAGFAVQALLATNLIE--EIKPALAKGHDFIKKSQVTENPSGDFKSMHRHSKGSWTF	474
<i>A. acidocaldarius</i> SHC	VWDTGLAVLALRAAGLPAD--HDRLVKAGEWLLDRQIT--VPGDWAVKRPNLKPGGFAF	365
<i>H. sapiens</i> ERG7	STLDCCGWI VSDCTAEALKAVLLLQEK--CPHVTEHIPRERLCDAVAVLLNMRNPD---G	498
<i>S. cerevisiae</i> ERG7	STKTQGYTVADCTAEAIKAIIMVKNSPVFSEVHHMISSERLFEGIDVLLNLQNGISFEYG	505
<i>A. thaliana</i> CAS	STADHGWI SDCTAEGLKAALLSKVP-KAIVGEPIDAKRLYEAVNVIISLQAD---G	527
<i>P. sativum</i> β AS	SDQDHGWQVSDCTAEGLKCLLLSLLP-PEIVGKMEPERLFDVSNLLLSLQSKK---G	529
<i>A. acidocaldarius</i> SHC	QFDNVYYPDVDDTAVVVWALNTRLRLPD-----ERRRRDAMTKGFRWIVGMQSSN---G	415

<i>H. sapiens</i> ERG7	GFATYETKRGHLLLELLNPSEVFGDIMIDYTYVECTSAVMQALKYFHKRFPEHRAAEIRE	558
<i>S. cerevisiae</i> ERG7	SFATYEKIKAPLAMETLNPAEVEFGNIMVEYPYVECTDSSVLGLTYFHKYF-DYRKEEIRT	564
<i>A. thaliana</i> CAS	GLATYELTRSYPWLELINPAETFGDIVIDYPYVECTSAIQALISFRKLYPGHRKKEVDE	587
<i>P. sativum</i> β AS	GLAAWEPAGAQEWLELLNPTEFFADIVVEHEYVECTGSAIQALVLFKKLYPGHRKKEIEN	589
<i>A. acidocaldarius</i> SHC	GWGAYDNDNTSDLPNHPFCDFG--EVTDPPESEDVTAHVLECFG-----SFGYDDAWK	466
<i>H. sapiens</i> ERG7	TLTQGLEFCRRQRADGSWEGSWGVCFTYGTWFGLEAFACMGQTYRDTACAIEVSRACDF	618
<i>S. cerevisiae</i> ERG7	RIRIAIEFIKKSQLPDGSWYGSWVICFTYAGMFALEALHTVGETYEN---SSTVRKGCDF	621
<i>A. thaliana</i> CAS	CIEKAVKFIESIQAADGSWYGSWAVCFYGTWFGVKGVLAVGKTLKN---SPHVAKACEF	644
<i>P. sativum</i> β AS	FIFNAVRFLEDTQTEDGSWYGNWGVCFYGSWFALGGLAAAGKTYTN---CAAIRKGVKF	646
<i>A. acidocaldarius</i> SHC	VIRRAVEYLKREQKPDGSWFRGWVNYLYGTGAVVSALKAVGIDTREP---YIQKALDW	522
<i>H. sapiens</i> ERG7	LLSRQMADGGWGEDFESCEERRYLSA--QSQIHNTCWAMMGLMAVRHPDIE--AQERGV	674
<i>S. cerevisiae</i> ERG7	LVSKQMKDGGWGESMKSELHSYVDSE--KSLVVQTAWALIALLFAEYPNKE--VIDRGI	677
<i>A. thaliana</i> CAS	LLSKQQPSGGWGESYLSQDKVYSNLDGNRSHVVNTAWAMLALIGAGQAEVDRKPLHRAA	704
<i>P. sativum</i> β AS	LLTTQREDGGWGESYLSPPKIIYVPLEGNRSNVVHTAWALMGLIHAGQSERDPTPLHRAA	706
<i>A. acidocaldarius</i> SHC	VEQHQNPDGGWGEDCRSYEDPAYAGKG--ASTPSQTAWALMALIAGGRAESE--AARRGV	578
<i>H. sapiens</i> ERG7	RCLLEKQLPNGDWPOENIAG-VENKSCAISYTSYRNI FPIWALGRFSQLYPERALAGHP	732
<i>S. cerevisiae</i> ERG7	DLLKNROEESGEWKFESVEG-VFNHSCATEYPSYRFLFPIKALGMYSRAYETHTL----	731
<i>A. thaliana</i> CAS	RYLINAQMENGDFPQOEIMG-VFNRCMIYAAAYRNI FPIWALGEYRCQVLLQQGE---	759
<i>P. sativum</i> β AS	KLLINSQLEQGDWPQOEITG-VFMKNCMLHYPMYRDIYPLWALAEYRRRVPLP-----	758
<i>A. acidocaldarius</i> SHC	QYL VETQRPDGGWDEPYTYTGTGFPGDFYLGTYMYRHVFPTLALGRYKQAIERR-----	631

《圖 1-18》*H. sapiens* ERG7、*S. cerevisiae* ERG7、*A. thaliana* CAS、*P. sativum* β AS 與 *A. acidocaldarius* SHC 氨基酸序列比對結果

從不同的環化酵素家族其蛋白質序列比對中，可以發現到有些氨基酸片段在各物種中都被高度保留。其中一段高度保留的氨基酸序列位於酵素活性區前端，其被認為是調控整個催化反應起始的氨基酸序列，在鯊烯環化酵素中的序列為 DDTA，而在氧化鯊烯環化酵素中則為 DCTA 《圖 1-19》。

另外一段高度保留的氨基酸序列稱為 Q-W 活性功能區域 (Q-W Motif)，其氨基酸序列為 [(K/R)(G/A) X_{2-3} (F/Y/W)(L/I/V) X_3 QX X_{2-5} GXW]。這段功能性區域在 OSLC 與 CAS 中皆有五次重複，而在 SHC 中則重複了

八次《圖 1-20》。早期學者認為 Q-W Motif 參與在酵素進行環化反應過程中，因鍵的斷裂與生成所引起的放熱反應以及其焓 (enthalpy) 釋放有關的步驟，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與 π 電子的交互作用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。

<i>H. sapiens</i> ERG7	STLDCGWIVSDCTAEALKAVLLLQEK--CPHVTEHIPRERLCAVAVLLNMRNPD----G 498
<i>S. cerevisiae</i> ERG7	STKTQGYTVADCTAEAIKAIIMVKNSPVFSEVHHMISSERLFEGIDVLLNLQNGISFEYG 505
<i>A. thaliana</i> CAS	STADHWPIISDCTAEGLKAALLLSKVP-KAIVGEPIDAKRLYEAVNVIISLQAD----G 527
<i>P. sativum</i> β AS	SDQDHGWQVSDCTAEGLKCLLLSLLP-PEIVGKMEPERLFDVSNLLLSLQSKK----G 529
<i>A. acidocaldarius</i> SHC	QFDNVYYPDVDDTAVVVWALNTRLRLPD-----ERRRRDAMTKGFRWIVGMQSSN----G 415

《圖 1-19》不同物種間 (氧化) 黨烯環化酵素內負責調控反應起始的胺基酸序列

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	EIFVRYLRSVQLPDGGW	142
OSC (S.c.)	QW5	127	ELIRYIVNTAHPVDGGW	143
SHC (A.a.)	QW5c	63	KLRRYLLHEQREDGTW	78
CAS (A.t.)	QW5	139	EMRRYLYNHQNEEDGGW	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	KACEFLLSKQQPSGGW	655
OSC (H.S.)	QW1	672	RGVRCLEKQLPNGDW	687
OSC (S.c.)	QW1	675	RGIDLLKNRQEESGEW	690
SHC (A.a.)	QW1	576	RGVQYLVETQRPDGGW	591
CAS (A.t.)	QW1	702	RAARYLINAQMENGDF	718

《圖 1-20》Q-W Motif 在環化酵素家族內之分佈情形。OSC(H.S.)為 *H. sapiens* ERG7；OSC(S.c.)為 *S. cerevisiae* ERG7；SHC(A.a.)為 *A. acidocaldarius* SHC；CAS(A.t.)為 *A. thaliana* CAS

然而，在 SHC 的 X-ray 結晶結構被解讀出來後，卻發現到 Q-W Motif 並不是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然與環化機制有關，而認為可能是作為穩定酵素結構的胺基酸。

從序列比對結果發現，酵母菌和人類氧化鯊烯-羊毛脂醇環化酵素及細菌的 SHC 三者約只有 40% 左右的相似度，但它們在結構、立體選擇性與催化機制上十分相似。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與 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。



第二章 研究目的

過去近半世紀以來，鯊烯及氧化鯊烯之環化反應機制與其演化方面之課題，一直是化學家及生物學家極度感興趣的課題。而本實驗室對於這類環化酵素的研究重點在於：（1）了解其催化氧化鯊烯之環化/重排重組反應之反應機構，進而對於其催化反應之複雜性以及其反應生成物之多樣性有更進一步的認識；（2）反應所牽涉到相關酵素之結構與活性關係的了解，有助於將來設計氧化鯊烯酵素之抑制劑；（3）研究細菌鯊烯環化酵素和動植物間的氧化鯊烯環化酵素在散開演化（Divergent evolution）的過程中，如何改變其活性位置胺基酸之結構，以產生具有不同物種專一性之產物。

在蛋白質結構的領域中，常會利用核磁共振光譜（Nuclear Magnetic Resonance, NMR）及蛋白質 X-ray 單晶繞射（Protein X-ray Crystallography, X-ray diffraction）解出蛋白質結構。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；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，我們所研究的酵母菌（*Saccharomyces cerevisiae*）氧化鯊烯環化酵素是由 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 個氨基酸序列，而其理論蛋白質分子量為 83.7 kDa；阿拉伯芥（*Arabidopsis thaliana*）中的環阿屯醇環化酵素由 759 個氨基酸所組成，分子量為 86kDa；豌豆（*Pisum sativum*）中的香桂素合成酵素由 758 個氨基酸所組成。分子量大加上此酵素與膜結合的特性，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，所以無法利用上述兩種方法來得到氧化鯊烯環化酵素的結構並探討與催化機制間的關係，也因此在其結構與催化機制方面的了解仍然有限。

隨著 1997 年細菌的鯊烯環化酵素⁴² 與 2004 年人類的氧化鯊烯-羊毛硬脂醇環化酵素 X-ray 結晶結構的解讀²⁴，提供了我們更多對酵母菌

ERG7 的了解，特別是人類氧化鯊烯-羊毛硬脂醇環化酵素的結晶結構。透過這些資訊我們可以知道，受質在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終止反應。在環化過程中，酵素活性區域的氨基酸基團扮演著辨識受質與穩定中間產物等十分重要的功能，所以近年來科學家也針對活性區域內的假設活性氨基酸進行了許多突變實驗的研究。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。突變的方式最常見的有二種，分別為定點突變與隨機突變。定點突變通常是針對某個特定位置的氨基酸進行取代、刪除或嵌入，用以探討某重要區段上特定氨基酸序列所執行的功能。而隨機突變則是對蛋白質上的氨基酸序列不預設位置做突變，通常會不知道被突變的位置，且突變的量較大而能建構一個突變株庫 (library)，之後再設計篩選方式從中挑選出所要的突變株。在本實驗中，我們選擇利用定點突變的方式，探討不同物種間氧化鯊烯環化酵素的催化機制，以及酵素結構與活性的關係，主要研究目標為：

(1) 藉由丙氨酸掃描法 (Alanin scanning)，將香桂素合成酵素 (*PsaβAS*) 和環阿屯醇合成酵素 (*AthCAS*) 中其假設活性區域的特定氨基酸位置，以人為方式進行分子演化，使其突變成丙氨酸，再藉由對突變株的產物分析，進一步探討環化酵素活性區其結構與催化機制的相關性，並闡明活性區域的殘基各自在催化機制上所扮演的角色。透過突變株產物圖譜與比例的建構，我們得以探討產物專一性與多樣性的關係，並希望能更進一步地了解環化酵素家族彼此間的演化性及催化反應上的差異。

(2) 利用飽和突變技術，將酵母菌氧化鯊烯環化酵素活性區中的 Cys457 突變成另外十九種氨基酸，並且對其進行突變產物分析，再利用電腦模擬方式，觀察突變過後周圍重要氨基酸的相對應位置是否有改變，更細部探討在催化上這些突變殘基對環化機制的影響，以及 Cys457 所扮演的角色。

第三章 實驗方法

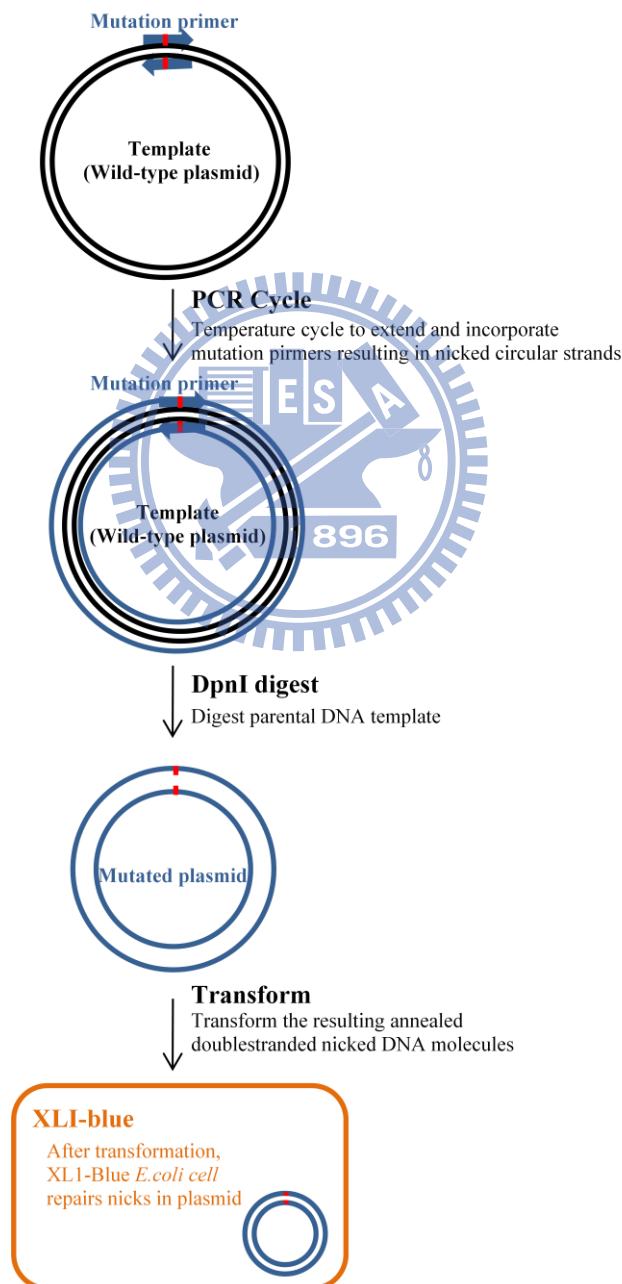
實驗策略流程



《圖 3-1》實驗流程圖

3.1 重組質體的建構

利用 Stratagene 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野生型 pRS314 PSY 或 pRS314 ERG7 作為模板，利用 QuikChange PCR Kit 所標示之標準流程《圖 3-2》，建構定點突變之質體。



《圖 3-2》 QuikChange Site-Directed Mutagenesis 示意圖

(1) 引子設計:

除了突變之胺基酸位置外(粗體表示),並在突變點之前後設計一個靜默突變 (Silent mutation, 紅色字體表示),藉此增加或減少一個限制酶切位以作為限制酶鑑定之用。如下表所列:

《表3-1》豌豆 PSY 假設活性區胺基酸定點突變之引子設計

PSY primer name	Sequence
CTL-PSY-II19A-Apa I 1	5'-CCA gCT CAA gCT gCA ggg CCC CTA TTT TTC-3'
CTL-PSY-F124A-Apa I 1	5'-CAA ATT gCA ggg CCC CTA gCT TTC ATg CCT-3'
CTL-PSY-F125A-Apa I 1	5'-CAA ATT gCA ggg CCC CTA TTT gCC ATg CCT CCT-3'
CTL-PSY-P128A-Sty I 1	5'-TTC ATg CCT g CC TTg gTT TTC TgT gTC-3'
CTL-PSY-L180A-Nde I 1	5'-gTA CTg CAg CCA ACT A CA TAT gTA TgC gg-3'
CTL-PSY-P217A-BstE II 1	5'-CAA CAC ggT ggg GTC ACC CAT ATA gCT TCg Tgg-3'
CTL-PSY-W219A-Cla I 1	5'-TAC CTT Cgg Cgg ggA AAA CTT ggC TAT CgA TAC TT-3'
CTL-PSY-W223A-Cla I 1	5'-ggg AAA ACT gCg CTA TCg ATA CTT ggT gTg-3'
CTL-PSY-M256A-Hinc II 1	5'-CAg CTA AAg CgT ggT gTT ATT gTC gAC Tgg TAT AC-3'
CTL-PSY-Y259A-Hinc II 1	5'-ATg Tgg TgT gCT TgT CgA CTg gTA TAC ATg-3'
CTL-PSY-V263A-Sal I 1	5'-ggT gTT ATT gTC gAC Tgg CAT ACA TgC CTA Tg-3'
CTL-PSY-Y264A-Spe I 1	5'-gTT ATT gTC gAC TAg TAg CCA TgC CTA Tg-3'
CTL-PSY-G369A-Mfe I 1	5'-CgA TAC CTT ACA ATT gCC TgT gTg gAA AAg-3'
CTL-PSY-C370A-Mfe I 1	5'-CgA TAC CTT ACA ATT ggC gCT gTg gAA AAg-3'

《表3-2》酵母菌 ERG7^{C457X} 飽和定點突變之引子設計

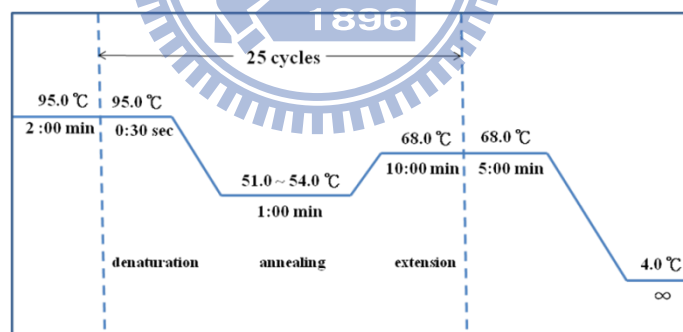
YOSC primer name	Sequence
CTL-YOSC-C457IKMNRST-Alwn I 1	5'-ggC TAT ACA gTg gCT gAT AN(C/g) ACT gCA gAA g-3'
CTL-YOSC-C457CFLSWY-Alwn I 1	5'-ggC TAT ACA gTg gCT gAT TN(C/g) ACT gCA gAA g-3'
CTL-YOSC-C457HLPQR-Alwn I 1	5'-ggC TAT ACA gTg gCT gAT CN(C/g) ACT gCA gAA g-3'
CTL-YOSC-C457ADEGV-Alwn I 1	5'-ggC TAT ACA gTg gCT gAT gN(C/g) ACT gCA gAA g-3'

(2) QuikChange Site-Directed Mutagenesis

利用 Stratagene 公司的 QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit，按照《表 3-3》所列之組成條件混合，再以《圖 3-3》所示溫度進行聚合酶連鎖反應來建構飽和定點突變之質體 DNA，其配對反應 (annealing) 溫度視引子的 T_m 值決定。

《表3-3》 QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit 之組成

Reagent	Volume (μ l)
Primer1 (1 μ g/ μ l)	0.5
Primer2 (1 μ g/ μ l)	0.5
Template	0.5
dNTP (10 mM)	1.6
<i>Pfu</i> II buffer	2
<i>Pfu</i> II polymerase	0.4
DDW	14.5
Total	20



《圖 3-3》 QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit 反應條件

(3) Dpn I 酵素切除母股 DNA

將 PCR 產物以《表 3-4》之條件放置在水浴槽中於 37°C 下反應四個小時，因 DpnI 酵素具有截切甲基化 DNA 之特性，因此我們可以用其去除不含有突變之母股 DNA。

《表3-4》 *Dpn I* 酵素切除母股 DNA 產物之條件

Reagent	Volume (μ l)
PCR products	8
10X NE Buffer 4	1
<i>Dpn I</i>	1

(4) 突變質體的放大與酵素鑑定

利用熱導入 (Heat shock) 進行轉形作用 (transformation)，使大腸桿菌吸收重組質體。從 -80°C 冰箱中取出勝任細胞於冰上緩慢解凍，取 $10\ \mu\text{l}$ 含有突變點之質體 DNA，並加入 $100\ \mu\text{l}$ 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 8,000rpm 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 培養基，在 37°C 下培養約 16 小時後，挑取單一菌落培養於 3 ml 的 LB 試管 (含 Ampicillin 100mg/L)，於 37°C 、200 rpm 震盪條件下培養 12 小時，即可利用 Plasmid Miniprep Purification Kit 抽取放大之質體 DNA。由於 XLI-Blue 含 *tetr* 基因，可以抵抗四環素生長，而質體 pRS314 帶有抗 Ampicillin 的基因，因此可利用 Ampicillin 篩選轉形細胞，只有轉型成功的細胞可同時在 Amp/LB 培養基及 Tet/LB 培養基生長。

將放大抽取所得之含有突變的質體 DNA，依《表 3-5》所示之條件，與限制酶和特定緩衝液混和，並置於 37°C 水浴槽中反應四小時，再以 DNA 電泳來確定質體是否含有所設計之突變點。

《表3-5》特定限制酶鑑定之材料條件

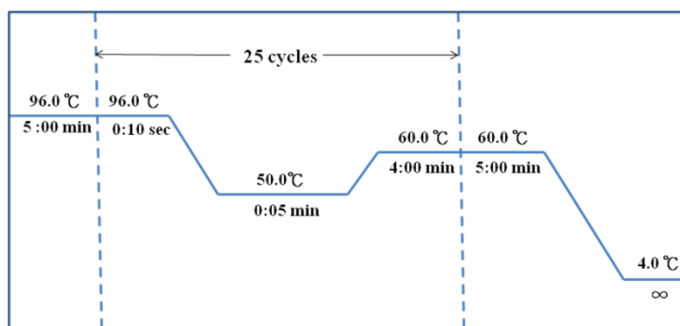
Reagent	Volume (μl) 1	Volume (μl) 2
Plasmid	2	2
10X NE Buffer	1	1
BSA	-	1
Enzyme	0.5	0.5
DDW	6.5	5.5

(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《表 3-6》所示之材料條件進行聚合酶連鎖反應，各突變質體之引子列於《表 3-7》。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。

《表3-6》BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit 所用之材料

Reagent	Volume (μl)
Plasmid	2
5X Sequencing Buffer	3
Primer	1
BigDye 3.1	0.8
DDW	13.2



《圖 3-4》BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit 所用之溫度

《表3-7》 pRS314 PSY、pRS313 CAS 與 pRS314 ERG7變質體定序引子對照表

PSY mutation	Sequence primer	CAS mutation	Sequence primer
I119A	CTL-PSY-L180A-Nde I 2	Y118A	CAS-L179A 2
F124A	CTL-PSY-L180A-Nde I 2	F123A	CAS-L179A 2
F125A	CTL-PSY-L180A-Nde I 2	L124A	CAS-L179A 2
P128A	CTL-PSY-L180A-Nde I 2	G127A	CAS-L179A 2
L180A	CTL-PSY-P128A-Sty I 1	L179A	Tkp5 Seq2
P217A	CTL-PSY-L180A-Nde I 1	T215A	CAS-L179A 1
W219A	CTL-PSY-L180A-Nde I 1	W217A	CAS-L179A 1
W223A	CTL-PSY-L180A-Nde I 1	W221A	CAS-L179A 1
M256A	CTL-PSY-P217A-BstE II 1	M254A	CAS-L179A 1
Y259A	CTL-PSY-P217A-BstE II 1	H257A	CAS-L179A 1
V263A	CTL-PSY-P217A-BstE II 1	V261A	CAS-L179A 1
Y264A	CTL-PSY-P217A-BstE II 1	Y262A	CAS-L179A 1
G369A	YCC-PSY-W418A-disHind III 1	G366A	CAS-W416A 2
C370A	YCC-PSY-W418A- disHind III 1	P367A	CAS-W416A 2
YOSC mutatin	Sequence primer		
C457X	YTL-OSCW390X- <i>Kpn</i> I 1		

3.2 酵母菌珠 TKW14c2 的電穿孔作用

於 -80°C 冰箱中取出 TKW14c2 菌株(MATa or MAT α *ERG7 Δ ::LEU2 hem1 Δ ::G418 ade2-101 his3 Δ -200 leu2- Δ 1 lys2-801 trp1- Δ 63 ura3-52*)，由於 TKW14c2 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（氨基酸 Methionine 在體內的生合成與 Heme 基因相關，因此當 Heme 基因被置換掉時，Methionine 的生合成會受影響）。將其接種於 3 ml YNB 溶液中（含有 Amino acid/ Hemin/ Ergosterol/ Glucose），試管在 30°C 培養箱中以 200 rpm 條件培養約三天。繼而將菌液倒入 100 ml 相同培養液，以相同條件培養至其 OD₆₀₀ 值介於

1 至 1.5 之間，之後將全部菌液在 4°C 下以 3,000 rpm 離心十分鐘，去除上清液後，以經高壓滅菌之二次（20 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 $\mu\text{l} \times n$ (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 YNB 培養基中（含有 Amino acid/ Hemin/ Ergosterol/ Glucose）《表 3-8》，於 30°C 恆溫箱中培養三至五天待其菌落生長即可進行功能性補充篩選分析。

《表3-8》因應不同載體(vector)所需之氨基酸添加表

載體（其內源性氨基酸）	Amino acid
pRS 313 (His)	Ade、Lys、Trp、Met、Uracil
pRS314 (Trp)	Ade、Lys、His、Met、Uracil
pYES2 (Uracil)	Ade、Lys、Trp、His、Met

3.3 功能性補充活性篩選

將質體轉植到 TKW14c2 酵母菌中，主要目的是為了利用宿主本身基因的缺陷，進行麥角固醇補充篩選（Ergosterol supplement）。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 + amino acid + Hemin（實驗組）與 Glucose + amino acid + 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。

3.4 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 溶液中（含 Glucose/Amino acid/ Hemin/ Ergosterol，若酵素具有酵母菌 ERG7 活性則不加 Ergosterol），於 37°C、200 rpm 震盪條件下培養約二至三天。將試管底部菌體重新懸浮均勻，再把菌液到入 100 ml 無菌之 YNB 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、200 rpm 震盪培養一個禮拜即可。

3.5 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。


3.6 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：4% 乙酸乙酯 (Ethyl acetate, EA) 與 96% 正己烷混合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 (氣相層析與質譜儀) 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 4% 乙酸乙酯與 96% 正己烷混合液作為沖提液，並以幫浦加壓將流出之溶劑依序以試管收下，再用 TLC 片將相同 Rf 值之試管收集，即可以迴旋濃縮機濃縮。

3.7 薄層色層分析



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 (TLC 片)，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 0.7 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。最後利用顯色

溶液會與有機化合物形成深色產物之特性，將平版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。

3.8 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 Agilent122-5731 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 Model5973MSD 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。



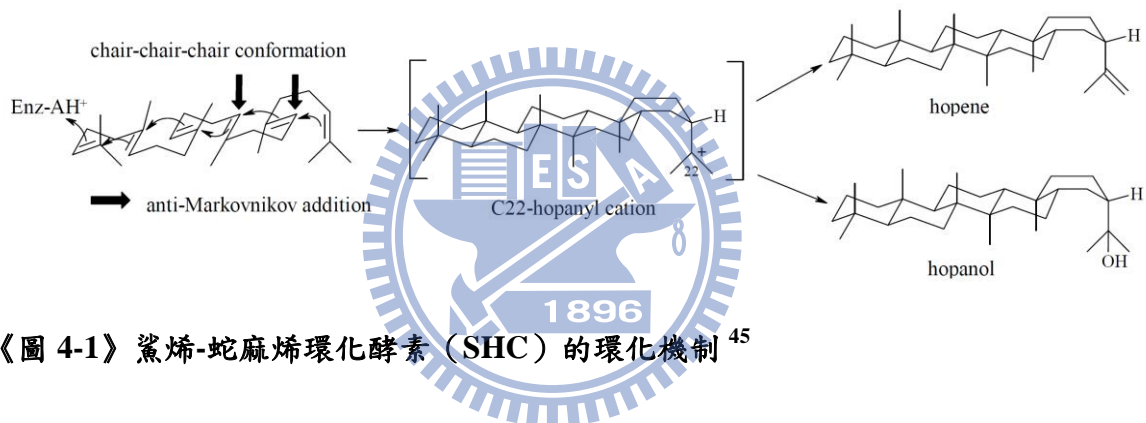
3.9 突變電腦模擬圖的建構

由於目前 *Sce*ERG7、*Ath*CAS 和 *Psa*PSY 都尚未有結晶結構被解析出來，所以我們在進行結構分析時，先利用相似度較高的人類氧化鯊烯-羊毛硬脂醇環化酵素結晶結構作為模版，模擬活性區域氨基酸的相對空間位置。突變的蛋白質結構是利用國家高速網路中心的應用程式 Accelrys Discovery Studio Client 2.5 中 Protein Modeling 底下的 Build homology Modeling 模擬建構，突變過後的分子與含有受質的野生型模板比對過後，在模擬結構中放入受質，再以國高的程式進行加氫 (Apply Force Field) 及能量最小化 (Minimization) 計算，模擬出當受質存在時酵素的最佳構形。

第四章 利用丙氨酸掃描法對豌豆和阿拉伯芥的 氧化鯊烯環化酵素假設活性區進行功能性分析

4.1 研究背景

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^{43,44}。細菌中的鯊烯-蛇麻烯環化酵素、哺乳類動物中的氧化鯊烯-羊毛硬脂醇環化酵素與植物中的環阿屯醇合成酵素和香桂素合成酵素同樣屬於三萜類環化酵素家族，因此具有類似的環化機制《圖 4-1》⁴⁵。

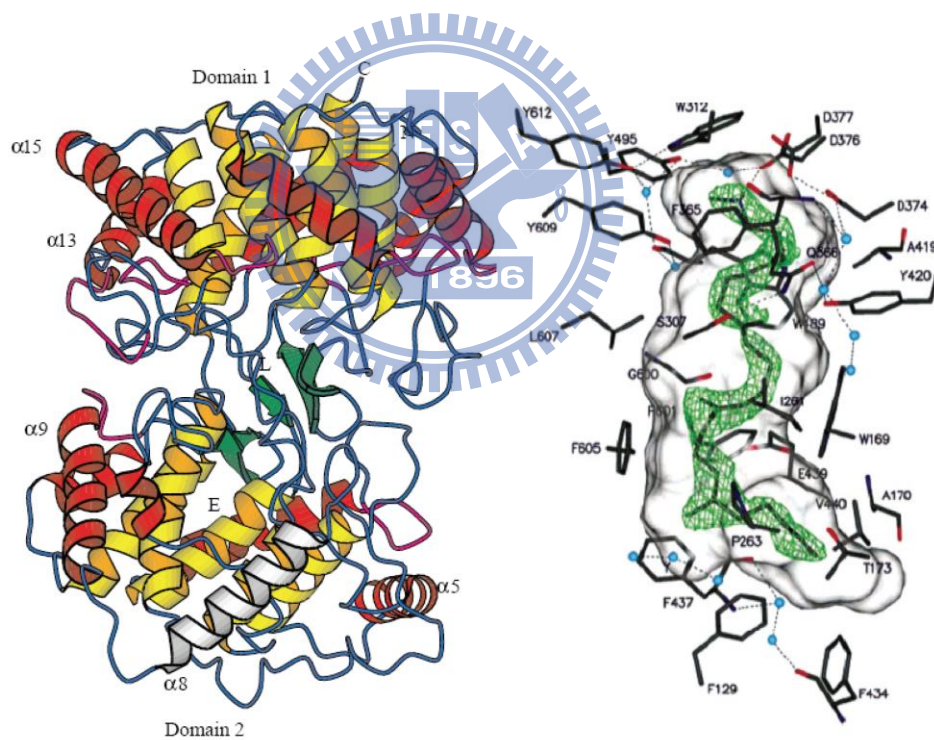


《圖 4-1》鯊烯-蛇麻烯環化酵素 (SHC) 的環化機制⁴⁵

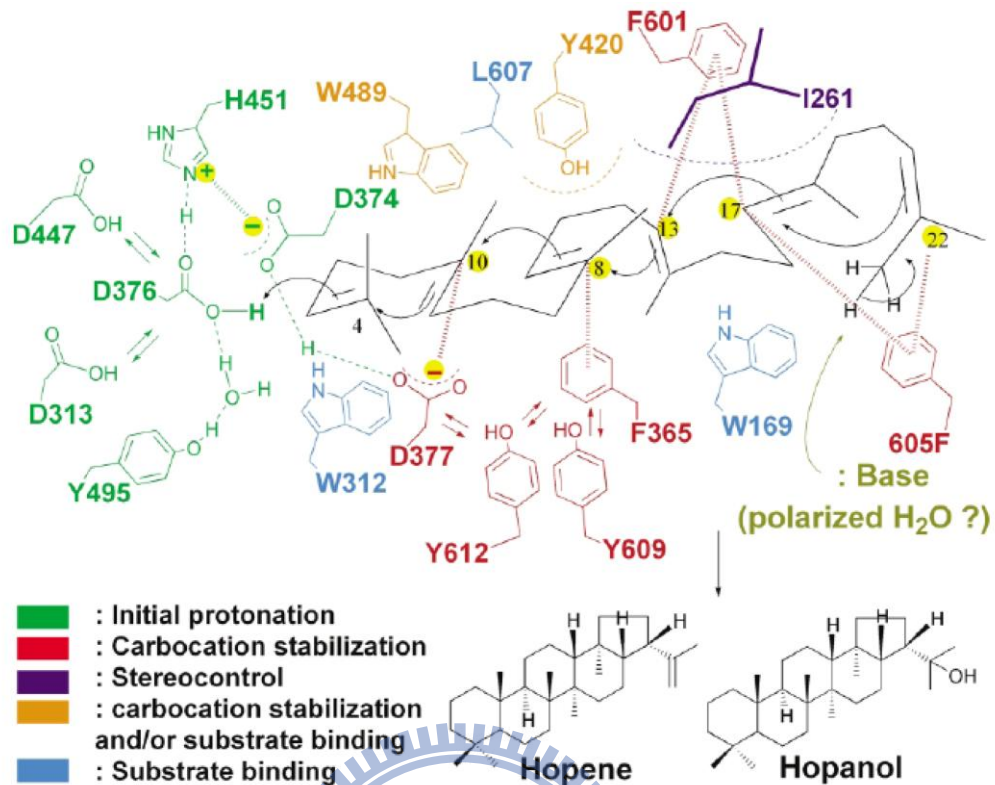
從受質的觀點來看，真核細胞的氧化鯊烯環化酵素利用氧化鯊烯作為受質，而細菌的鯊烯環化酵素則是利用鯊烯作為受質，所以鯊烯環化酵素被認為出現在演化過程中較早的厭氧時期。另外，細菌的鯊烯環化酵素對受質的專一性也較低，不僅可以利用鯊烯作為受質，對於氧化鯊烯或是其光學異構物甚至是一般的多萜醇也可以進行反應。相反地，真核的氧化鯊烯環化酵素則具有很高的受質結構專一性。若從環化機制上來觀察，鯊烯環化酵素在反應機制和形態上都是以較簡單的方式進行。當它在進行環化作用時，受質會以較穩定的”椅形-椅形-椅形”的結構存在，這使得受質需要的酵素助力較小，而在細菌的鯊烯環化酵素中，也不具有最後的骨架重排步驟。

鯊烯-蛇麻烯環化酵素 (*AacSHC*) 是三萜類環化酵素家族中最早被解出 X-ray 晶體結構的，並於 1997 年發表在 *Science* 期刊中⁴²。除此之外，1998 年 Abe 等人也曾利用固醇類抑制劑 Ro48-8071 來研究 *AacSHC* 結構與其催化功能的相關性⁴⁶。在《圖 4-2》中，鯊烯-蛇麻烯環化酵素的晶體結構指出酵素蛋白質立體結構的活性區範圍及活性區氨基酸的相對位置，這些結構的資訊，也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。從結晶結構上可以發現 *AacSHC* 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)。雖然鯊烯-蛇麻烯環化酵素為膜蛋白，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活性區域中，並由 Asp376 提供質子起始環化反應。其中 His451 會和 Asp376 形成氫鍵，加上 Tyr495 和 Asp376 以一個水分子相維繫，共同增強 Asp376 所擔任之路易士酸的角色，以協助起始環化反應。蛋白質序列第 374 至第 380 個氨基酸區域以及受質鍵結凹槽區之芳香族氨基酸包括 Trp312、Phe365、Trp489、Tyr495、Phe601、Tyr609 與 Tyr612 皆為高度保留之氨基酸，其利用富含電子的苯環及 Indole 側鏈，經由碳陽離子與 π 電子共振作用加以穩定碳陽離子中間物，並加速環化作用，使得鯊烯能順利被催化重組⁴⁷。Trp489 被認為會利用其氨基酸側鏈的 π 電子基團穩定 C-10 碳陽離子，藉以穩定 A 環的形成；Asp377 和 Asp374 之間形成一個空間距離相近的氫鍵對 (2.6 Å)，並利用其氨基酸側鏈所攜帶負電來穩定鯊烯的 C-10 碳陽離子¹⁸。而 Phe365、Tyr420 和 Tyr609 被認為具有穩定 C-8 碳陽離子中間物的功能，因此它們與蛇麻烯的 B、C 環的形成有關。定點突變實驗也加以證明，當 Tyr420 突變成 Ala 與 Gly 時，會得到三環與雙環的產物，推測是利用其立體空間結構來幫助蛇麻烯骨架在 B 與 C 環的結構中進行排列。Phe601、Phe605 和 Trp169 則可穩定 6-6-6-5 環的 C-18 碳陽離子中間物。酵素中，Trp169 和 Phe605 除了空間位置十分靠近 D 環和 E 環外，在所有鯊烯-蛇麻烯環化酵

素中也具有高度保留性，且在氧化鯊烯-羊毛硬脂醇環化酵素並不具有這樣的氨基酸，所以被認為是參與蛇麻烯 E 環形成的關鍵胺基酸位置。蛇麻烯環化酵素的最終步驟是藉由具立體選擇性的脫氫反應形成 hop-22(29)-en (80%)，或是藉由水的加成產生 hopan-22-ol (20%) 而終止整個環化反應。Wendt 等人推測，酵素是利用 Gln262、Glu45、Glu95 和 Arg127 所形成的氫鍵網絡將水分子極性化，以利極性化的水分子吸引質子或羥基的加成。定點突變的實驗也證實，Glu45Ala 和 Glu45Asp 突變會使 hopen 與 hopanol 的產物比例產生巨大的改變。另外，值得注意的是藉由受質類似物所得部分環化的產物也都是以脫氫中止反應，而非羥基的加成來終止反應。



《圖 4-2》右圖為 *AacSHC* 之 X-ray 晶體結構圖。C 為胺基酸的 COOH 端；N 為 NH₂ 端；L 為抑制劑(LDAO)接合位置；E 為酵素表面唯一的非極性區域，其大小約為 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。左圖為鯊烯環化酵素之活性區氨基酸位置⁴²



《圖 4-3》鯊烯-蛇麻烯環化酵素活性區域內假設活性氨基酸的位置與功能⁴⁸

我們利用分子模擬的方式，以鯊烯蛇麻烯環化酵素(AacSHC)的 X-ray 晶體結構為模板，經序列比對的方式找出其相應於豌豆中香桂素合成酵素(PsaPSY)與阿拉伯芥中環阿屯醇合成酵素(AthCAS)的活性區氨基酸《表 4-1》，再經丙氨酸掃描法，也就是把假設的活性區氨基酸突變成丙氨酸，利用此法遮蔽特定位置上所帶的官能基的功能，探索當此位置官能基被去除時，會產生何種情形，藉此推估原先殘基所參與的功能為何。一些研究團隊探討酵素立體結構對於環化反應上的催化機制，已清楚地建立反應受質經重排重組後其所形成碳陽離子中間物的可能催化機制。配合這些理論模組及催化機制，我們假若此氨基酸在環化的催化過程中具有決定性影響，經此重要突變後，會因為改變了酵素參與環化的殘基，或影響受質在酵素中的摺疊方式，或者破壞了可穩定反應受質碳陽離子中間物的結構，而有可能改變產物專一性或有多樣產物的產生。

透過這些實驗假設，我們設計了丙氨酸掃描法的定點突變，希望能更進一步闡明香桂素合成酵素 (*PsaPSY*) 和環阿屯醇合成酵素 (*AthCAS*) 環化酵素的反應機制，視其活性區域氨基酸的突變效應，是否影響或改變酵素原本的活性，同時，經由產物分析，搜尋是否有新產物的生成或是生成其他環化酵素家族的產物，希望藉此對環化酵素家族間的產物專一性及多樣性提供進一步的資訊。

《表4-1》 *A. acidocaldarius* SHC、 *P. sativum* PSY、 *A. thaliana* CAS 和 *S. cerevisiae* ERG7 十四個假設活性區之氨基酸比對

	<i>AacSHC</i>	<i>PsaPSY</i>	<i>AthCAS</i>	<i>SceERG7</i>
1	L36	I119A	Y118A	Y99
2	T41	F124A	F123A	F104
3	M42	F125A	L124A	M105
4	E45	P128A	G127A	G108
5	E93	L180A	L179A	L158
6	R127	P217A	T215A	P192
7	F129	W219A	W217A	W194
8	W133	W223A	W221A	W198
9	F166	M256A	M254A	W231
10	W169	Y259A	H257A	H234
11	T173	V263A	V261A	V238
12	V174	Y264A	Y262A	Y239
13	I261	G369A	G366A	A339
14	Q262	C370A	P367A	P340

4.2 丙氨酸掃描之結果與討論

4.2.1 建構假設活性區之定點突變株

我們依照第 3.1 章節所敘述的方法，建構香桂素合成酵素 (*PsaPSY*) 假設活性區之定點突變株。首先設計十四組進行聚合酶連鎖反應時所需要的引子對，如《表 4-2》所示，將所要突變的氨基酸位置分別設計成 Ala 取代氨基酸；同時，我們在序列前端或後端設計一個靜默突變 (Silent mutation)，突變過後的序列可以讓限制酶辨認而多切一刀。以質體 pRS314 PSY 作為母股，與所設計的引子對進行聚合酶連鎖反應。經酵素確認帶有突變之質體後，再以 ABI PRISM 3100 auto-sequencer 進行定序反應，確認突變點之氨基酸。

環阿屯醇合成酵素 (*AthCAS*) 假設活性區之定點突變之質體已由謝雅如學姊建構完成，因此得到質體後，我們用限制酶 NotI 和 XhoI 確定其質體為 pRS313 CAS，再以 ABI PRISM 3100 auto-sequencer 進行定序反應，確認突變點之氨基酸。

《表4-2》 *Psa*PSY之酵素鑑定

PSY putative active site	digestion enzyme	digested fragment
PSY ^{I119A}	Apa I	0.7Kb、1.9Kb、4.7Kb
PSY ^{F124A}	Apa I	0.7Kb、1.9Kb、4.7Kb
PSY ^{F125A}	Apa I	0.7Kb、1.9Kb、4.7Kb
PSY ^{P128A}	Sty I +Xho I	1.9Kb、5.4Kb
PSY ^{L180A}	Nde I	0.6Kb、6.7Kb
PSY ^{P217A}	BstE II +Xho I	1.6Kb、5.7Kb
PSY ^{W219A}	Cla I +Xho I	1.6Kb、5.7Kb
PSY ^{W223A}	Cla I +Xho I	1.6Kb、5.7Kb
PSY ^{M256A}	Hinc II	100bp、7.2Kb
PSY ^{Y259A}	Hinc II	100bp、7.2Kb
PSY ^{V263A}	Sal I Xho I	1.5Kb、5.8Kb
PSY ^{Y264A}	Spe I Xho I	1.5Kb、5.8Kb
PSY ^{G369A}	Mfe I	1.5Kb、5.8Kb
PSY ^{C370A}	Mfe I	0.8Kb、2.7Kb、3.8Kb

4.2.2 定點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轉殖到酵母菌 TKW14c2 中，並依照 3.3 章節所陳述的方式進行功能性篩選。將質體轉殖到這株酵母菌的主要目的是為了利用宿主本身在基因上的缺陷，進行麥角固醇補充篩選（Ergosterol supplement）。結果證明，藉由這些單一假設活性區胺基酸之丙胺酸突變，並不能改變其原本的酵素活性而產生羊毛硬脂醇產物《表 4-3》。

《表4-3》 *PsaPSY* 假設活性區功能性篩選表

$PSY^{single\ mutant}$	Sequence confirmation	Ergosterol supplement	$CAS^{single\ mutant}$	Sequence confirmation	Ergosterol supplement
PSY^{I119A}	V	—	CAS^{Y118A}	V	—
PSY^{F124A}	V	—	CAS^{F123A}	V	—
PSY^{F125A}	V	—	CAS^{L124A}	V	—
PSY^{P128A}	V	—	CAS^{G127A}	V	—
PSY^{L180A}	V	—	CAS^{L179A}	V	—
PSY^{P217A}	V	—	CAS^{T215A}	V	—
PSY^{W219A}	V	—	CAS^{W217A}	V	—
PSY^{W223A}	V	—	CAS^{W221A}	V	—
PSY^{M256A}	V	—	CAS^{M254A}	V	—
PSY^{Y259A}	V	—	CAS^{H257A}	V	—
PSY^{V263A}	V	—	CAS^{V261A}	V	—
PSY^{Y264A}	V	—	CAS^{Y262A}	V	—
PSY^{G369A}	V	—	CAS^{G366A}	V	—
PSY^{C370A}	V	—	CAS^{P367A}	V	—

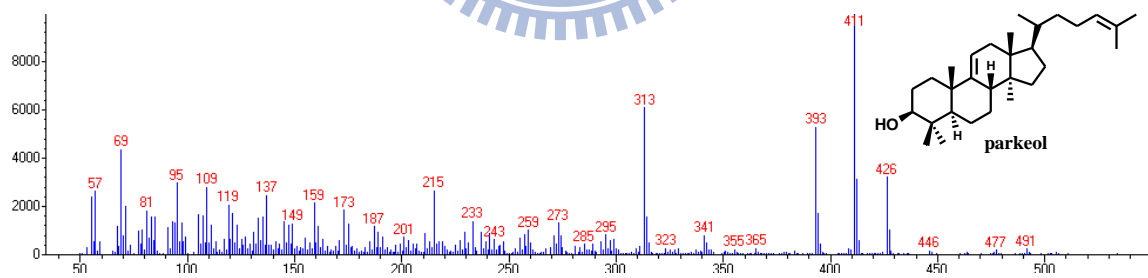
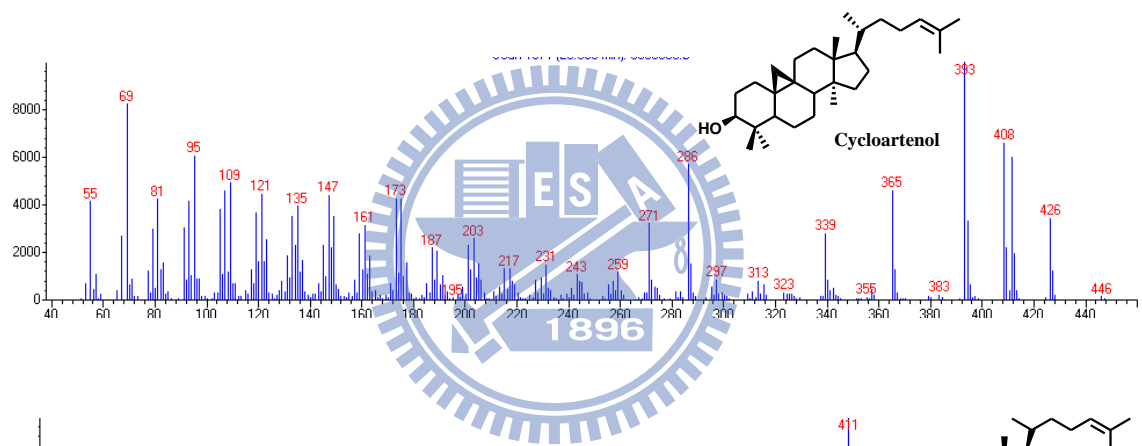
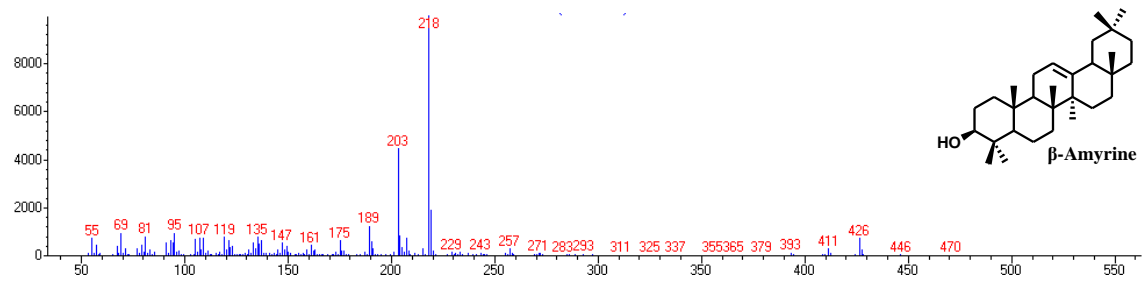
4.2.3 *Psa*PSY 定點突變株產物分析

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 YNB 培養液 (YNB 含 Glucose/ Amino acid /Heme /Ergosterol) 之錐形瓶中培養約一個星期，致死的突變株需額外添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，以石油醚進行萃取，留下非皂化性之脂質，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中，由 GC-MS 來鑒定產物《圖 4-4》與決定各產物之比例《表 4-4》。

《表4-4》丙氨酸掃描 *Psa*PSY 與 *Ath*CAS 假設活性區氨基酸之產物分析表

<i>PSY</i> ^{single mutant}	Product analysis		<i>CAS</i> ^{single mutant}	Product analysis	
	β -amyrin			parkeol	cycloartenol
<i>PSY</i> ^{WT}	100%		<i>CAS</i> ^{WT}		100%
<i>PSY</i> ^{H119A}	100%		<i>CAS</i> ^{Y118A}		N.D.
<i>PSY</i> ^{F124A}	100%		<i>CAS</i> ^{F123A}		100%
<i>PSY</i> ^{F125A}	100% (mediate)		<i>CAS</i> ^{L124A}		N.D.
<i>PSY</i> ^{P128A}	100% (minor)		<i>CAS</i> ^{G127A}		100%
<i>PSY</i> ^{L180A}	100%		<i>CAS</i> ^{L179A}		100%
<i>PSY</i> ^{P217A}	100%		<i>CAS</i> ^{T215A}		100%
<i>PSY</i> ^{W219A}	100%		<i>CAS</i> ^{W217A}		100%
<i>PSY</i> ^{W223A}	100%		<i>CAS</i> ^{W221A}		N.D.
<i>PSY</i> ^{M256A}	100%		<i>CAS</i> ^{M254A}		N.D.
<i>PSY</i> ^{Y259A}	N.D.		<i>CAS</i> ^{H257A}	100% (trace)	
<i>PSY</i> ^{V263A}	100%		<i>CAS</i> ^{V261A}		100% (minor)
<i>PSY</i> ^{Y264A}	100%		<i>CAS</i> ^{Y262A}		100%
<i>PSY</i> ^{G369A}	N.D.		<i>CAS</i> ^{G366A}		100% (minor)
<i>PSY</i> ^{C370A}	100%		<i>CAS</i> ^{P367A}		N.D.

- **Mediate:** The amount of the product is about 1/2 compared to product produced by wild type.
- **Minor:** The amount of the product is about 1/3 compared to product produced by wild type.
- **Trace:** The amount of the product is about 1/100 compared to product produced by wild type.

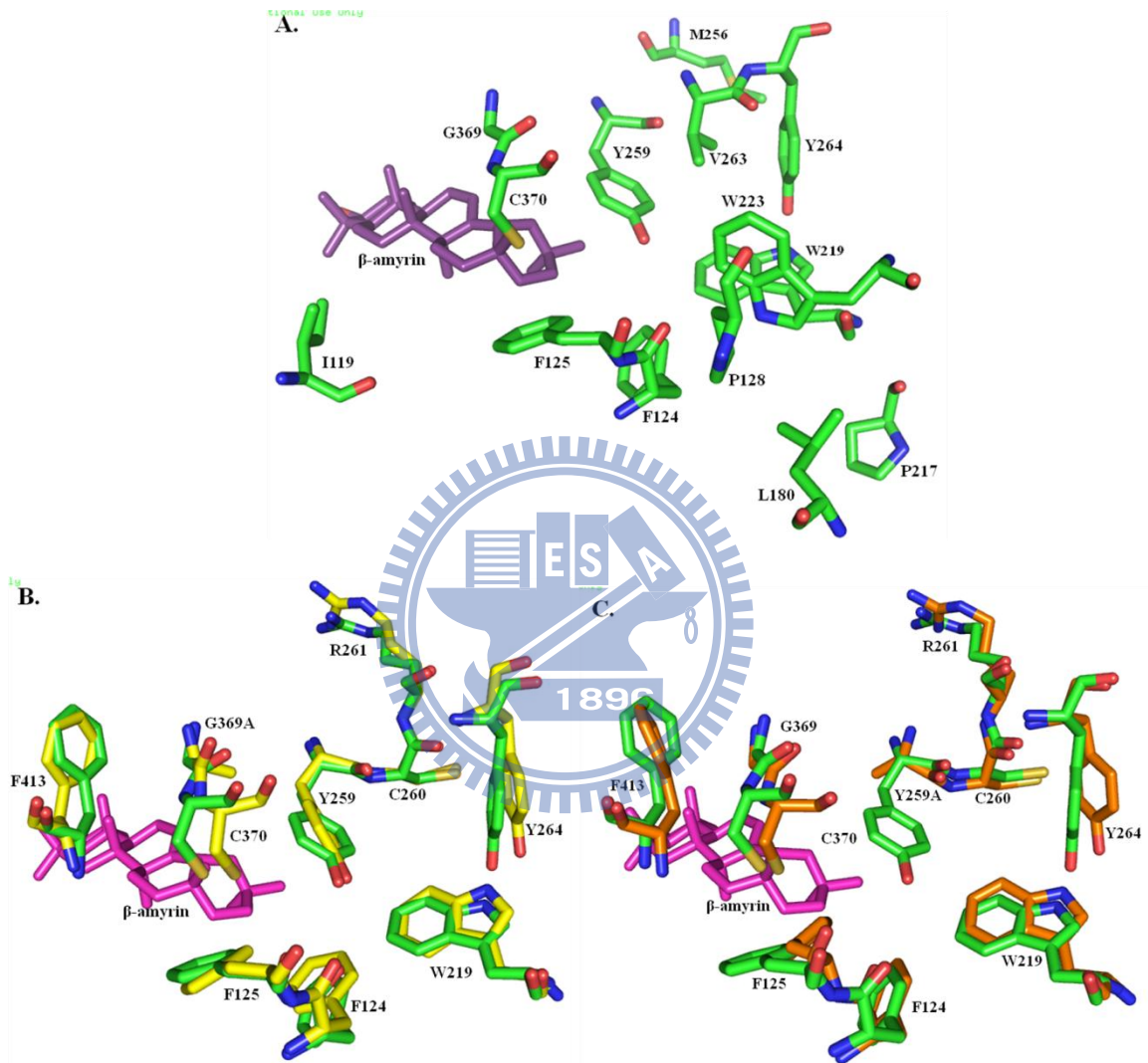


《圖 4-4》不同氧化鯊烯環化產物標準品之質譜與其結構對照圖

4.2.4 *PsaPSY* 突變株電腦模擬分析與結果討論

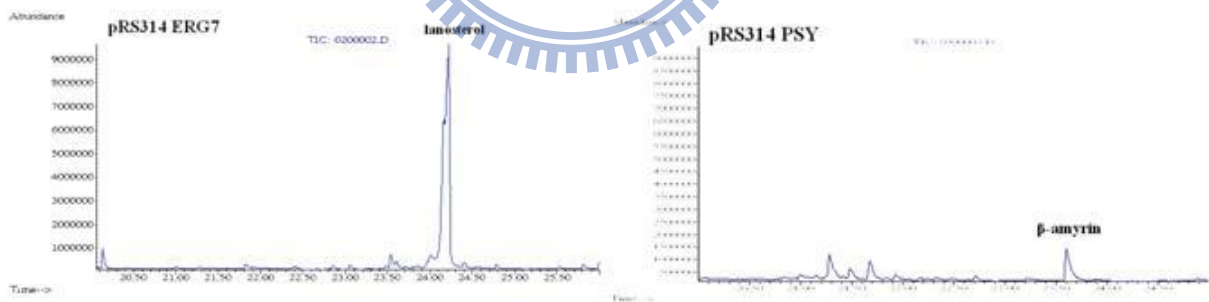
由於目前 *PsaPSY* 和 *AthCAS* 都尚未有結晶結構被解析出來，所以我們在進行的結構分析時，是利用相似度較高的人類氧化鯊烯-羊毛硬脂醇環化酵素結晶結構作為模版，來模擬酵素活性區域內其氨基酸的相對空間位置。我們依照第 3.9 章節所敘述的方法建構突變蛋白質分子結構，《圖 4-5 A》為 β -香桂素合成酵素的蛋白質分子模擬結果，並顯示其以 β -香桂素為受質時十四個假設活性氨基酸的相對位置。在 *PsaPSY* 十四個假設活性區的單定點突變中，除了 PSY^{Y259A} 與 PSY^{G369A} 會使酵素失活以外，其它突變的結果仍都保有野生型的酵素環化功能，並能生成 β -香桂素。從分子模擬圖《圖 4-5》來看，我們發現當 Tyr259 和 Gly369 突變點成 Ala 後，會影響其週遭氨基酸環境，使其位移或是產生角度上的轉變，尤其是帶有芳香族性質基團的變動最大，這可能是導致環化反應中的碳陽離子不穩定，而無法生成 β -香桂素的原因。





《圖 4-5》A. 野生型 *PsaPSY* 活性區結構模擬圖；
 B. 突變株 *PsaPSY*^{G369A} (黃色) 與野生型 (綠色) 之空間比較；
 C. 突變株 *PsaPSY*^{Y259A} (橘色) 與野生型 (綠色) 之空間比較

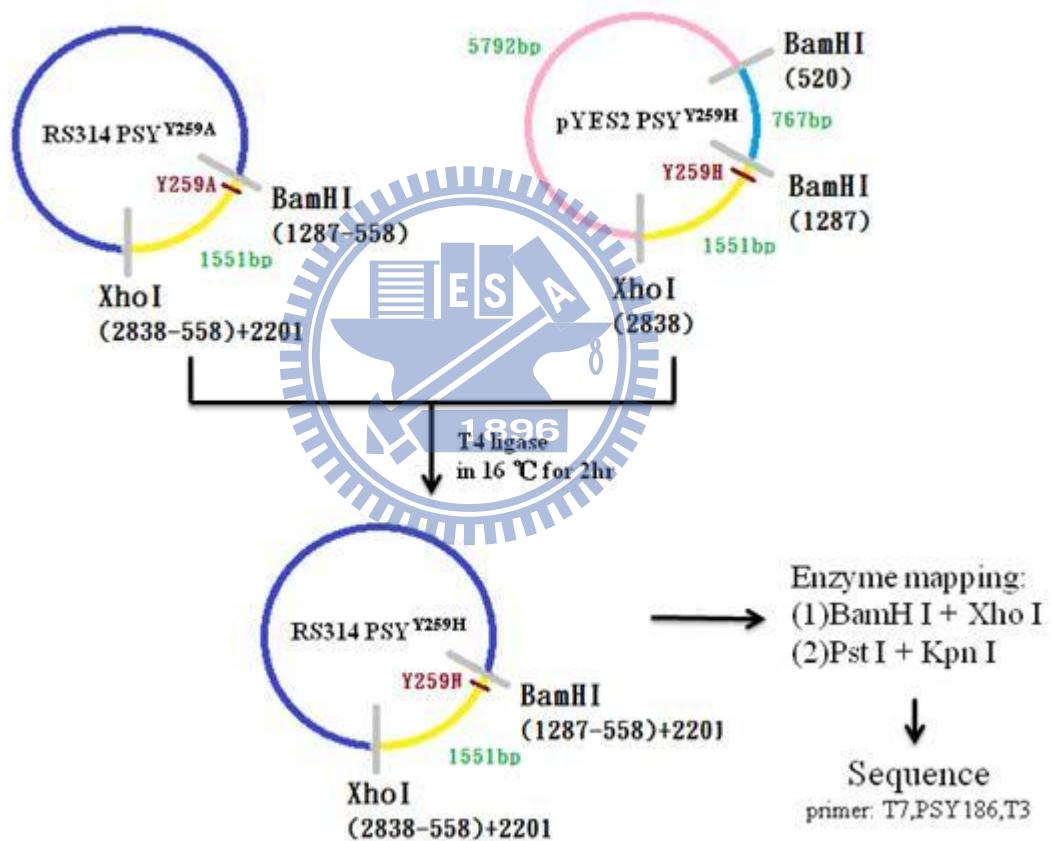
由於在野生型 pRS314 PSY 及其各突變點中發現，其產物生成量比起 pRS314 ERG7 所生成羊毛硬脂醇產物的濃度低許多，從質譜儀上來看，野生型 pRS314 ERG7 產生的羊毛硬脂醇產物吸收質可達 10^7 ，但野生型 pRS314 PSY 所生成的 β -香桂素吸收值卻只有 10^6 左右《圖 4-6》。除此之外，在其他十二個保有野生型酵素活性的突變株其產物分布中，只發現 β -香桂素的生成，卻沒有發現其他在不同碳原子脫氫中止反應或是提早結束的環化產物。而在 2000 年 Kushiro 等人在研究 β -香桂素合成酵素和羽扇醇合成酵素的關係時發現，經由分析 PNY^{Y261H}（對應豌豆為 PSY^{Y259}）的定點突變產物，可得到不同於野生型的三種四環產物，推測 Tyr261 可能對於達瑪烯碳陽離子（dammarenyl cation）之後的碳陽離子中間產物有穩定的作用⁴⁹。而在我們自己的實驗室裡，也曾利用能大量表現基因的載體 pYES2 進行 PSY^{Y259H} 的定點突變實驗，在突變的產物分析中，我們也確實看到一些非 β -香桂素的四環產物。綜合上述因素，我們懷疑 pRS314 PSY 在酵母菌中因表現量不佳，導致新產物因太過微量而無法看到，此外因為 Ala 突變而導致沒有新產物生成的因素亦不能加以排除。



《圖 4-6》野生型 pRS314 ERG7 與 pRS314 PSY 經管柱層析後的 GC-MS 圖

因此，依照《圖 4-7》描述的方法，我們利用限制酶 BamHI+XhoI 進行剪切，並將原本在 pYES2 PSY^{Y259H} 上的 PSY^{Y259H} 片段與 pRS314 PSY^{Y259A} 上的 PSY^{Y259A} 片段進行置換，因而得到 pRS314 PSY^{Y259H} 突變株。在麥角固醇補充篩選部分，pRS314 PSY^{Y259H} 和其他突變點一樣，無法補足

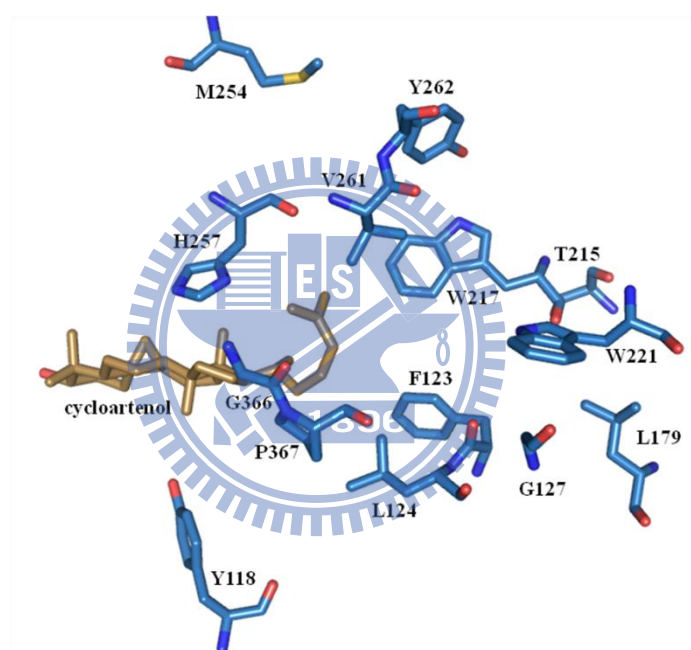
失去的 ERG7 功能，之後依照 4.2.3 章節敘述的方法進行突變株的產物分析。在 pRS314 PSY^{Y259H} 產物分析中，和 pYES2 PSY^{Y259H} 一樣的是失去原本的酵素活性，無法生成 β -香桂素，但卻沒有看到其他四環產物的生成。所以我們認為， β -香桂素環化酵素活性區的單定點突變沒有看到未知產物的原因，可能是因為 PSY 是植物基因非酵母菌基因，導致在酵母菌內表現量不佳所造成。



《圖 4-7》利用限制酶切接取得 pRS314 PSY^{Y259H} 之方法

4.2.5 *AthCAS* 突變株結果分析與討論

《圖 4-8》顯示當以環阿屯醇為受質時，其假設活性區內的十四個氨基酸的相對位置，這些氨基酸大多分布在 C、D 環或是受質側鏈附近，有些甚至是屬於第二層的氨基酸。在 *AthCAS* 假設活性區的單定點突變中， CAS^{H257A} 會產生微量的 parkeol，而 CAS^{Y118A} 、 CAS^{L124A} 、 CAS^{W221A} 、 CAS^{M254A} 和 CAS^{P367A} 五個定點突變則會使酵素失活，其餘剩下的六個突變株仍都保有野生型的 *AthCAS* 環化功能，生成環阿屯醇。

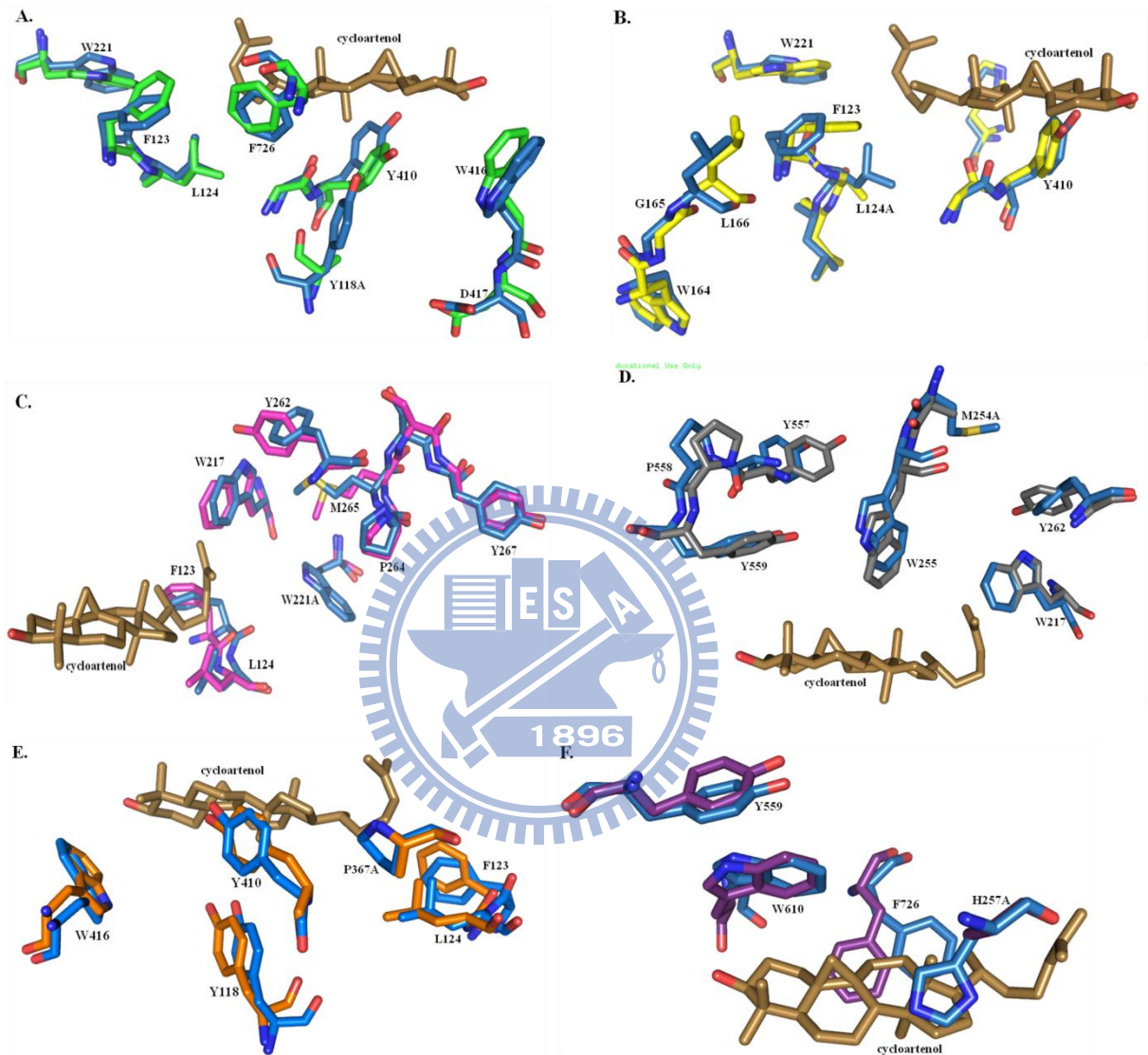


《圖 4-8》野生型 *AthCAS* 十四個活性區氨基酸結構模擬圖

比對 *AthCAS* 與氧化鯊烯-羊毛硬脂醇環化酵素的序列，發現二者的胺基酸保留性高，活性區對應的胺基酸大部分為相同的氨基酸，只有在 CAS^{Lue124} 、 CAS^{Thr215} 、 CAS^{Met254} 其對應的氨基酸在官能基特性上有明顯差異，故此，猜測這三個殘基位置及其鄰近的氨基酸可能是造成終止反應脫氫位置不同的重要決定位置。但經丙氨酸突變後，我們發現 CAS^{T215A} 對酵素活性並無影響，而 CAS^{L124A} 、 CAS^{M254A} 會使酵素失去活性，另外由其結

構模擬圖如《圖 4-9》顯示，當 Leu124 突變成 Ala 後，會影響 Phe123 和 Trp221 的位置，並且產生角度上的改變，也使 Glu165 和 Lue166 有明顯的偏移；而 Met254 突變後，經由主鏈的改變會影響其鄰近 Trp255 的位置，使其向活性區內位移，除此之外，鄰近的 Tyr262、Tyr557、Pro558 和 Tyr557 等氨基酸也都有微幅不小的變動。故此推論，這些活性區氨基酸因自身殘基在空間上的改變，會影響其鄰近氨基酸在空間角度或位置上改變，而影響原本酵素活性。此外，在 CAS^{Y118A}、CAS^{Y221A} 和 CAS^{P367A} 的模擬結構圖中，我們也看到有類似的效應：CAS^{Y118A} 影響 Tyr410、Trp416、Phe726 和 Phe123，CAS^{Y221A} 則影響 Phe123、Trp217、Tyr262 和 Pro264，以及 CAS^{P367A} 影響 Phe123、Leu124、Tyr118 等等。或許因為所突變的氨基酸位於活性區內，所以只要做單點突變，就會影響到其它同樣位在活性區中鄰近的芳香族氨基酸，而這些芳香族基團又是在環化過程中穩定高能中間物所不可或缺的，因此才會造成酵素失去原本活性。

此外，我們只有在 CAS^{H257A} 觀察到非環阿屯產物，其之所以產生 parkeol，可能是因為當 His 突變成殘基較小的 Ala 後，會使得受質的 C 環浮動的空間增加，且經由結構模擬發現，在此突變株中 Phe726 苯環的位置會偏折到 C11 位置附近，如《圖 4-9 F》所示，因此我們認為其可經由環上 π 電子來穩定 C9 與 C11 上過渡態的碳陽離子，使其最終在此脫氫而生成 parkeol。另外，我們認為 pRS313 CAS 和 pRS314 PSY 有相同的問題，因為其皆為植物基因而非酵母菌基因，所以用酵母菌表現時，表現量不如酵母菌本身基因 ERG7，因此對於新產物的生成難以觀測。



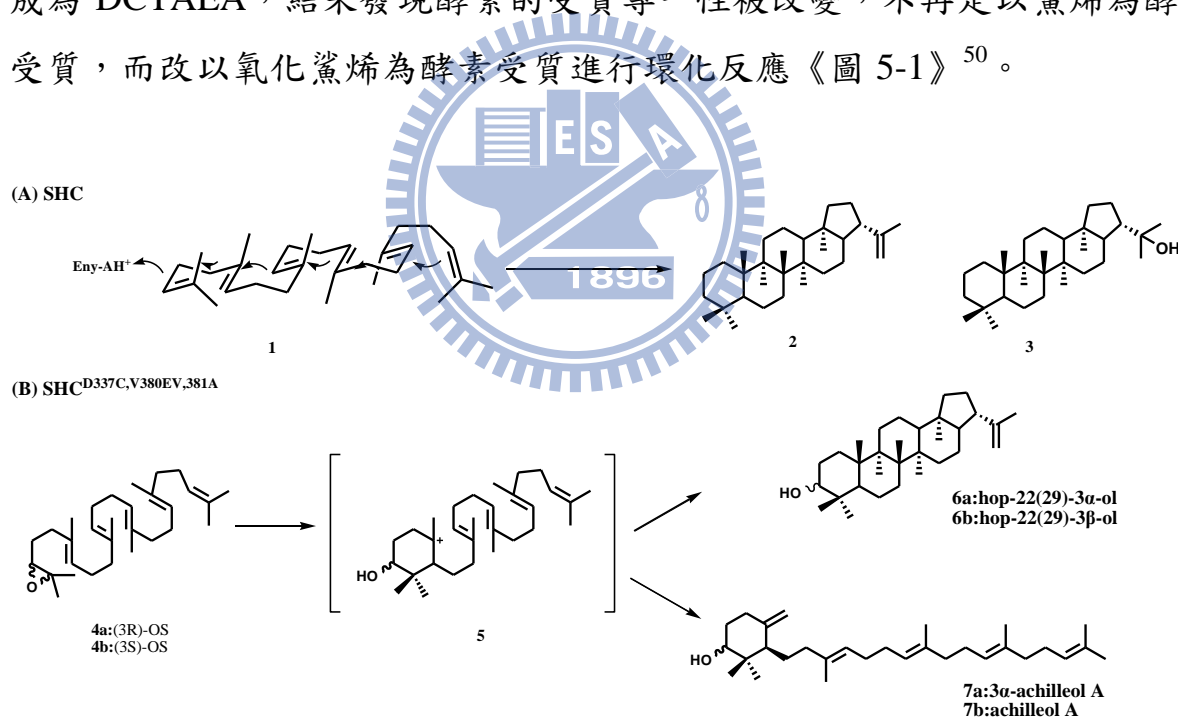
《圖 4-9》A. 突變株 $AthCAS^{Y118A}$ (綠色) 與野生型 $AthCAS$ (藍色) 之空間比較；
 B. 突變株 $AthCAS^{L124A}$ (黃色) 與野生型 $AthCAS$ (藍色) 之空間比較；
 C. 突變株 $AthCAS^{W221A}$ (桃色) 與野生型 $AthCAS$ (藍色) 之空間比較；
 D. 突變株 $AthCAS^{M254A}$ (灰色) 與野生型 $AthCAS$ (藍色) 之空間比較；
 E. 突變株 $AthCAS^{P367A}$ (橘色) 與野生型 $AthCAS$ (藍色) 之空間比較；
 F. 突變株 $AthCAS^{H257A}$ (紫色) 與野生型 $AthCAS$ (藍色) 之空間比較

第五章 利用飽和定點突變對酵母菌 $ERG7^{C457X}$

進行功能性分析

5.1 研究背景

在三萜類環化酵素家族序列比對中，除了 Q-W 活性功能區域之外，還有另一段高度保留的氨基酸序列，其被認為是負責開環起始反應以及辨認受質的片段。在鯊烯環化酵素家族中，這一段氨基酸序列為 DDTAVV；但在氧化鯊烯環化酵素家族中，其氨基酸序列則演化為 DCTAEA。在 2000 年，Tongyun 等人將鯊烯環化酵素的 DDTAVV 片段做三定點突變，使其成為 DCTAEA，結果發現酵素的受質專一性被改變，不再是以鯊烯為酵素受質，而改以氧化鯊烯為酵素受質進行環化反應《圖 5-1》⁵⁰。

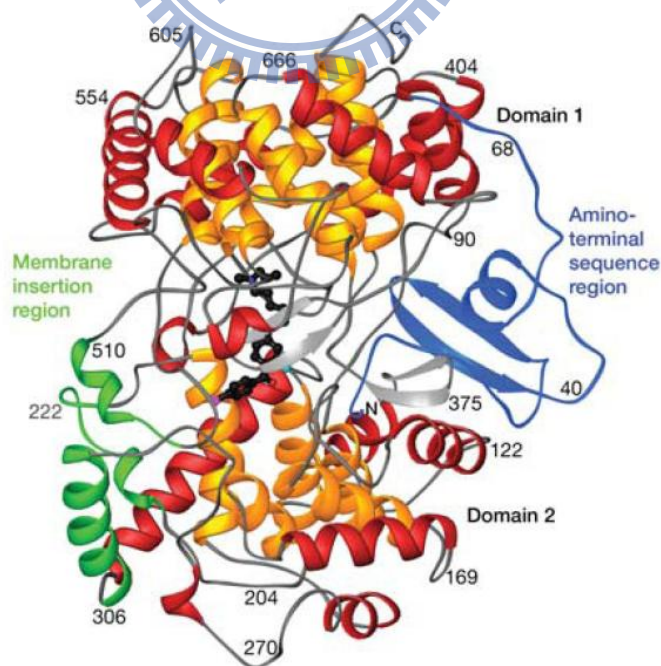


《圖 5-1》野生型和三定點突變株之鯊烯環化酵素環化受質與其產物⁵⁰

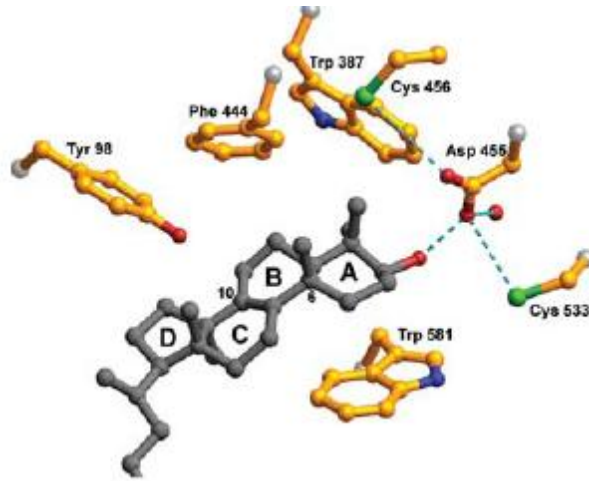
在早期，由 Wendt 等人所解出的鯊烯環化酵素結晶結構常常被用於作為瞭解氧化鯊烯環化酵素環化機制的比較模版，但由於鯊烯環化酵素的演化程度較早，且其受質為鯊烯而非氧化鯊烯，所以將其作為同源性模組有

其限制性。除此之外，氧化鯊烯環化酵素與鯊烯環化酵素在環化機制上的明顯差異，以及人類與酵母菌的氧化鯊烯環化酵素的同源性較高等考量之下，我們選擇改以人類氧化鯊烯-羊毛硬脂醇環化酵素的結晶結構作為研究酵母菌 ERG7 之高立體選擇性的環化機制的模板。

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，並發表於 Nature 期刊中²⁴。由於人類氧化鯊烯-羊毛硬脂醇環化酵素結構的確定《圖 5-2》，使得學者得以對於酵素活性區域及其胺基酸基團可能參與的反應機制有更進一步了解，並且可以利用人類氧化鯊烯-羊毛硬脂醇環化酵素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。人類氧化鯊烯-羊毛硬脂醇環化酵素的 X-ray 結晶結構指出，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 5-3》。



《圖 5-2》人類氧化鯊烯-羊毛硬脂醇環化酵素 X-ray 晶體結構，圖中黑色處為抑制劑 Ro48-8071，用以指出與其受質結合的反應活性位置



《圖 5-3》人類氧化鯊烯環化酵素 X-ray 結晶結構指出，Cys456 和 Cys533 兩者皆與 Asp455 間有氫鍵連結，藉此增加 Asp455 酸性，促使環化反應進行

綜合以上三萜類環化酵素家族的結晶結構與其它能輔助佐證的突變實驗結果，我們推論在氧化鯊烯酵素 DCTAEA motif 中的 Cys 基團對於整個環化機制可能具有一些重要功能，特別是在酵素受質選擇方面。因此，我們首先利用人類氧化鯊烯-羊毛硬脂醇環化酵素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氨基酸位置，並發現酵母菌 ERG7^{Cys457} 的位置並沒有太大改變。接下來我們利用飽和定點突變的方法，將 ERG7^{Cys457} 突變成其它 19 種胺基酸，並且進行突變產物的分析，再利用電腦模擬的方式，觀察突變過後氨基酸的相對應位置以及其與受質的距離是否有改變，來研究酵母菌 ERG7^{Cys457} 所具有的功能。

5.2 實驗結果與討論

5.2.1 建構酵母菌 $ERG7^{C457X}$ 定點飽和突變株

我們依照第 3.1 章節敘述的方法，首先設計四組進行聚合酶連鎖反應時所需要的引子，將所要突變的胺基酸位置 (Cys457) 分別設計成 AN(C/g)、TN(C/g)、CN(C/g)、gN(C/g) 序列，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，突變過後的序列可以讓限制酶 AlwNI 辨認而多切一刀。以質體 pRS314 ERG7 作為母股，與所設計的引子對進行聚合酶連鎖反應。

經由所設計引子放大母股而得到的帶有突變的質體，其含有兩個 AlwNI 切位，片段大小分別是 2.7Kb 和 5.3Kb；而野生型的 pRS314 ERG7 只含有一個 AlwNI 切位，片段大小為 8Kb。經酵素確認帶有突變之質體，再以 ABI PRISM 3100 auto-sequencer 進行定序反應，辨別各突變點之胺基酸的取代基。

5.2.2 酵母菌 $ERG7^{C457X}$ 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轉殖到酵母菌 TKW14c2 中。將質體轉殖到這株酵母菌中的主要目的是為了利用宿主本身基因上的缺陷，進行麥角固醇補充篩選。藉由這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。由功能性篩選的表中，我們可以發現當 Cys457 位置換成帶有大環取代基時 (Phe、Tyr、Trp)，會導致其酵素失活；此外，所有的正電荷的胺基酸 (His、Lys 與 Arg) 和 Asp 突變也會使得菌株死亡《表 5-1》。利用此一篩選方式可找出對於 Cys457 在 ERG7 環化的機制中，扮演關鍵性角色的胺基酸取代。

《表5-1》酵母菌 ERG7^{C457X} 功能性篩選

Substitutions for Cys457		AlwNI mapping	Sequence confirmation	Ergosterol supplement	
Polar	Cys(C)	V	V	+	
	S(Ser)	V	V	+	
	Thr(T)	V	V	+	
Nonpolar	Gly(G)	V	V	+	
	Ala(A)	V	V	+	
	Val(V)	V	V	+	
	Leu(L)	V	V	+	
	Ile(I)	V	V	+	
	Met(M)	V	V	+	
	Pro (P)	V	V	+	
	Amide group	Asn (N)	V	V	+
		Gln (Q)	V	V	+
Aromatic group	Phe (F)	V	V	-	
	Tyr (Y)	V	V	-	
	Trp (W)	V	V	-	
Acidic group	Asp (D)	V	V	-	
	Glu (E)	V	V	+	
Basic group	His(H)	V	V	-	
	Lys(K)	V	V	-	
	Arg(R)	V	V	-	

5.2.3 酵母菌 $ERG7^{C457X}$ 突變株產物分析

經過功能性的篩選後，我們利用第 4.2.3 章節中所敘述的方法進行 $ERG7^{C457X}$ 突變株的產物分析，並由 GC-MS 來鑒定產物《圖 5-4》與分析產物的比例《表 5-2》。

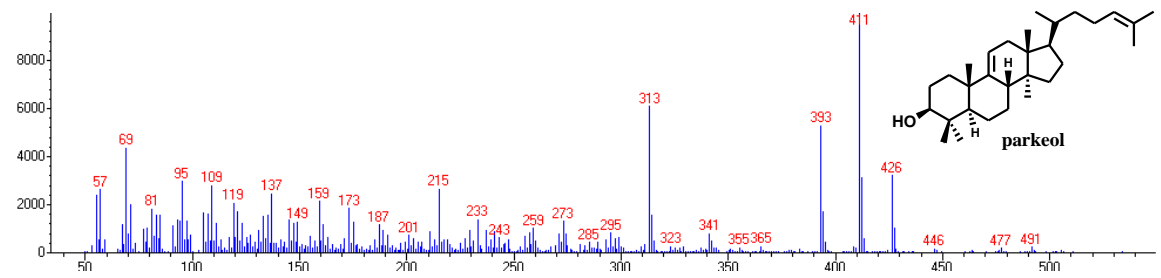
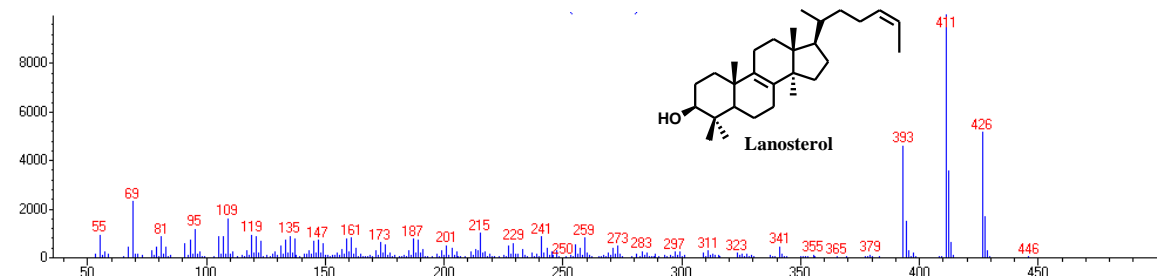
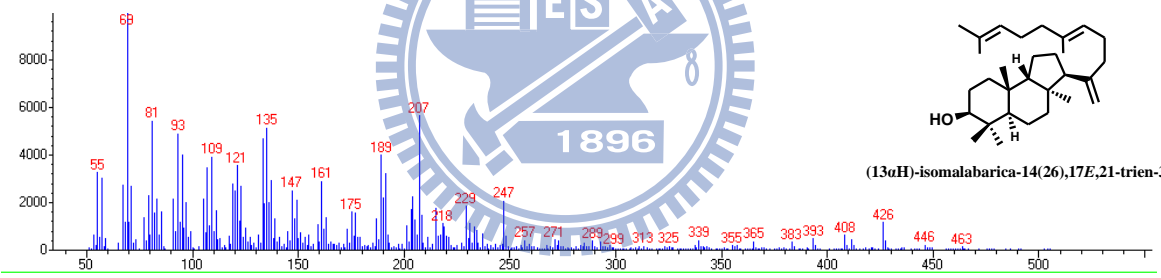
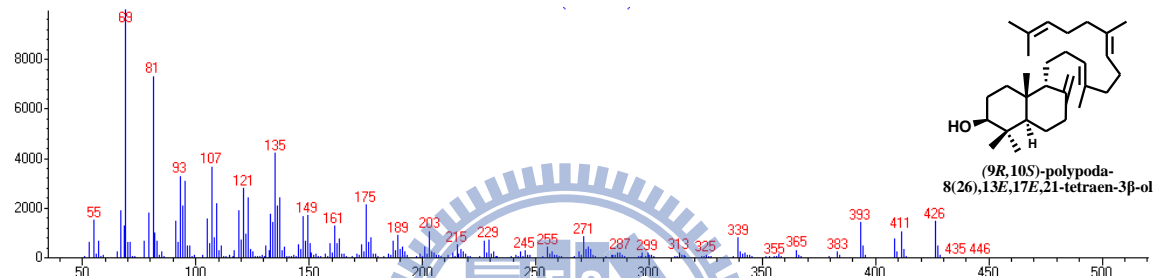
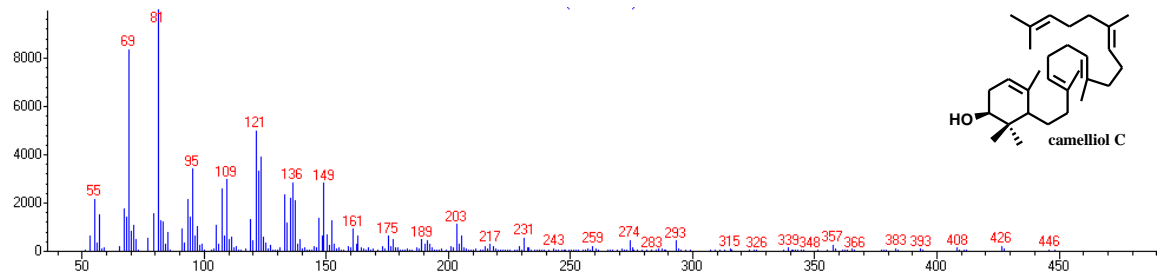
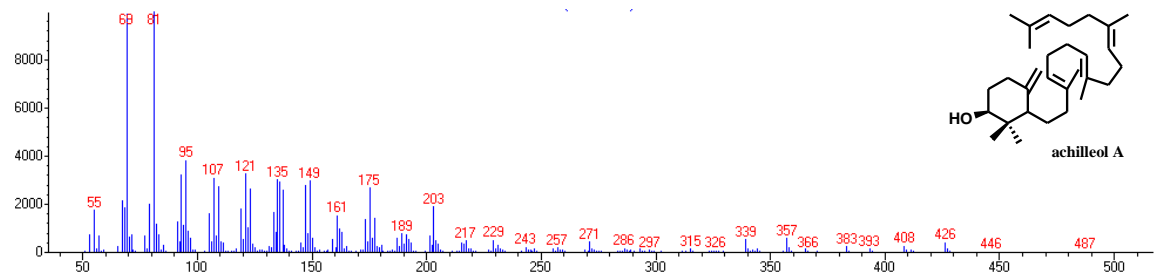
對照《表 5-1》與《表 5-2》我們可以發現在七個會使酵素失去活性的突變株中，只有芳香族氨基酸 Phe 取代會產生微量單環和雙環產物，至於其他致死的六個氨基酸取代 (Tyr、Trp、His、Lys、Arg 和 Asp) 的產物中，則完全沒有 m/z 值為 426 的產物。另外，在其它的氨基酸取代中，除了 Gly 的 Achilleol A 產量有顯著地增加以外，產物大都還是以羊毛硬脂醇為主。在 Thr、Ala、Val 和 Leu 氨基酸取代中，除了羊毛硬脂醇外，並伴隨著一些三環產物 *isomalabarica-14(26),17E*, *21-trien-3 β -ol* 或四環產物 *parkeol* 的生成。



《表5-2》酵母菌 ERG7^{C457X} 的產物分析表：

1. Achilleol A ; 2. Camelliol C ; 3. (9R,10S)-polypoda-8(26),13E,17E,21-tetraen-3 β-ol ;
4. isomalabarica-14(26),17E, 21-trien-3β-ol ; 5. Lanosterol (羊毛硬脂醇) ; 6. Parkeol

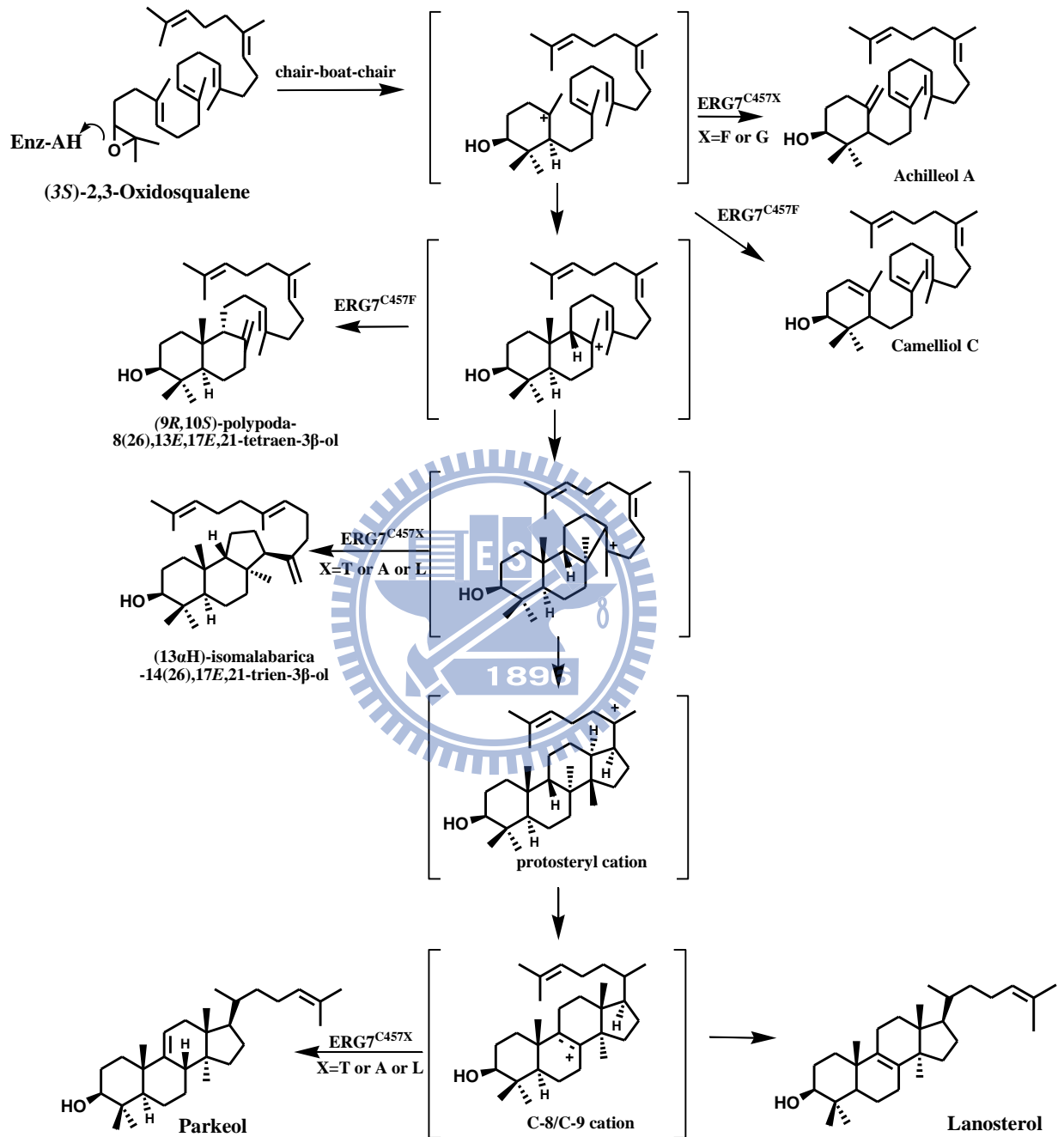
Substitutions for Cys457		Product percentage(%)					
		1	2	3	4	5	6
Polar	Cys(C)					100 %	
	Ser(S)					100 %	
	Thr(T)				4 %	96 %	
Nonpolar	Gly(G)	74.6 %				25.4 %	
	Ala(A)				1.9 %	93.5 %	4.6 %
	Val(V)					97.5 %	2.5 %
	Leu(L)				2.2 %	93.6 %	4.2 %
	Ile(I)					100 %	
	Met(M)					100 %	
	Pro (P)					100 %	
Amide group	Asn (N)					100 %	
	Gln (Q)					100 %	
Aromatic group	Phe (F)	54.3 %	36.2 %	9.5 %			
	Tyr (Y)				N.D.		
	Trp (W)				N.D.		
Acidic group	Asp (D)				N.D.		
	Glu (E)					100 %	
Basic group	His(H)				N.D.		
	Lys(K)				N.D.		
	Arg(R)				N.D.		



《圖 5-4》酵母菌 ERG7^{C457X} 其產物質譜與其結構對照圖

5.2.4 酵母菌 $ERG7^{C457X}$ 產物生成途徑推測

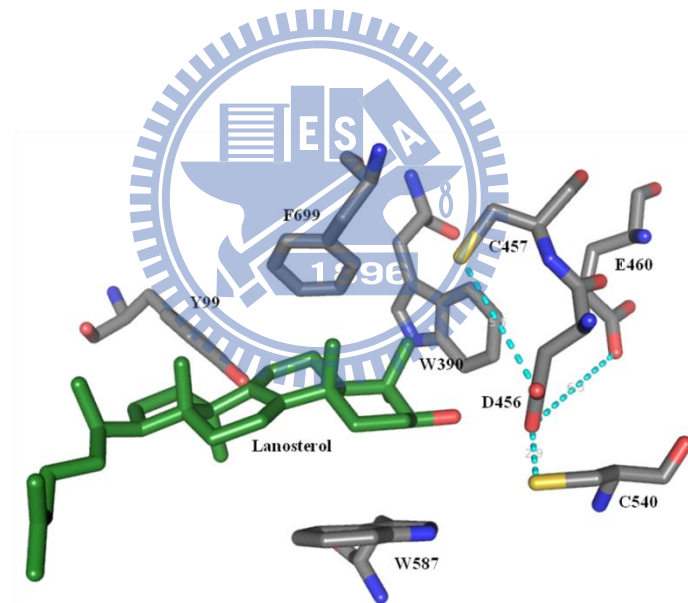
《圖 5-5》為酵母菌 $ERG7^{C457X}$ 定點飽和突變的產物生成途徑推測圖。在 $ERG7^{W457G}$ 中，突變產物以單環產物 Achilleol A 為主；除此之外，在突變株 $ERG7^{W457F}$ 中，也會得到少量的單環和雙環產物。這些產物的生成是因為 A 環環化形成 C-6 碳陽離子後，隨即藉由脫氫終止環化反應，因而得到單環的 Achilleol A 或 Camelliol C；若單環 C-6 碳陽離子能繼續環化形成 B 環，產生雙環的 C-8 碳陽離子再行脫氫反應，則會生成雙環的 (9R,10S)-polypoda-8(26),13E,17E,21-tetraen-3 β -ol。反觀其餘仍具有酵素活性的突變株，產物皆以羊毛硬脂醇為主，但在某些的突變點 ($ERG7^{C457T}$ 、 $ERG7^{C457A}$ 、 $ERG7^{C457V}$ 、 $ERG7^{C457L}$) 中，會伴隨著微量野生型 $ERG7$ 所沒有的三環或四環產物生成。三環產物 isomalabarica-14(26),17E,21-trien-3 β -ol 的生成是當環化反應進行到欲行 C 環擴環反應前，其依反馬可尼可夫法則，形成 6-6-5 三環 C-14 碳陽離子中間物時，有一部分受質會在此脫氫並終止反應而形成。至於四環產物 parkeol 和羊毛硬脂醇唯一的不同是最後在 lanosteryl C-8/C-9 cation 脫氫的位置。



《圖 5-5》酵母菌 ERG7^{C457X} 產物生成路徑推測圖

5.2.5 酵母菌 $ERG7^{C457X}$ 突變株電腦模擬分析

我們利用 3.9 章節所描述的方法，利用相似度較高的人類氧化鯊烯環化酵素結晶結構作為模版，模擬酵母菌中 $ERG7$ 活性區域氨基酸的相對空間位置，以進行酵母菌 $ERG7$ 的結構分析。《圖 5-6》顯示當以羊毛硬脂醇為受質時，Cys457 的位置與其他幾個開環反應相關的氨基酸之相對位置。其中 Asp456 已由實驗證實為酵母菌 $ERG7$ 進行開環時提供質子的氨基酸；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⁴²。由產物分析結果發現，當酵母菌 Cys457 位置以不同屬性的殘基進行取代時，會改變其產物的分布。

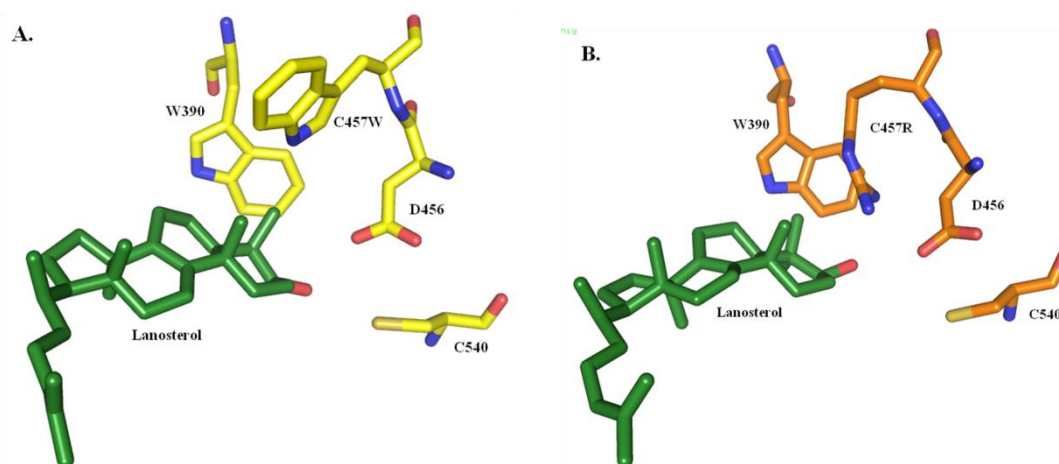


《圖 5-6》野生型酵母菌 $ERG7^{C457}$ 與附近氨基酸結構模擬圖

5.2.5.1 帶電荷氨基酸和芳香族氨基酸對開環的影響

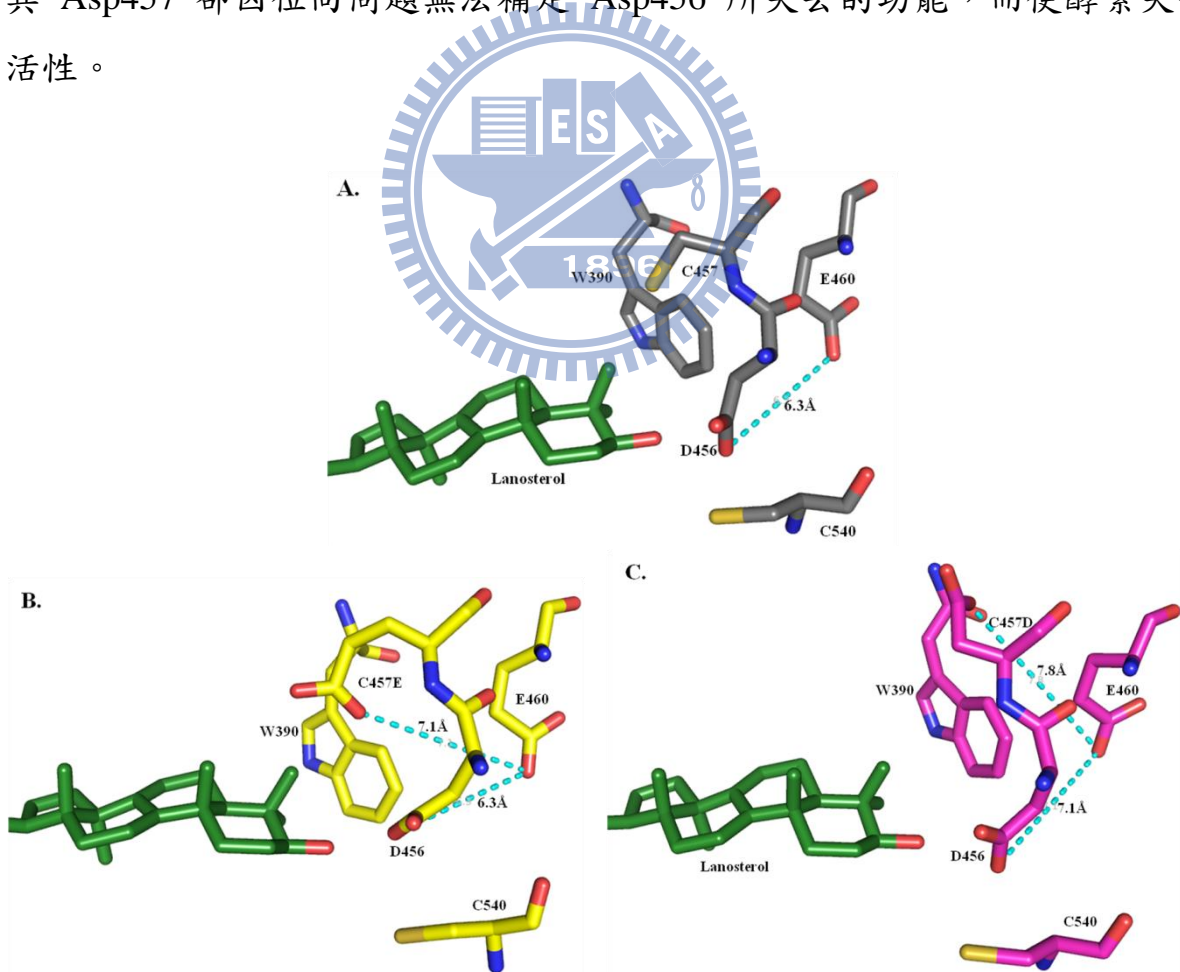
在先前鯊烯-蛇麻烯環化酵素三定點突變研究中，曾經指出 Asp337 (對應到酵母菌 ERG7 為 Cys457) 可能與辨認受質的角色有關⁵⁰。而在酵母菌飽和突變實驗中，經麥角固醇補充篩選分析可以發現，三個帶正電的鹼性氨基酸 His、Lys 與 Arg 都會造成酵母菌 ERG7 的失活，而導致菌株的死亡，經由外加麥角固醇培養之後進行產物分析的結果也發現，鹼性氨基酸取代的酵素不具有能環化氧化鯊烯之環化酵素的功能。除此之外，在三個帶有芳香族氨基酸的取代中，除了 Phe 會產生微量的單環和雙環產物之外，Tyr 和 Trp 也都造成酵母菌 ERG7 失活。

以 Arg 和 Trp 為例，分子模擬結果顯示當 Cys457 位置突變為帶有芳香族或鹼性殘基的氨基酸時，其氨基酸側鏈會伸向活性區內，而 Cys457 位置就在提供質子開環的 Asp456 旁，巨大的突變殘基會形成嚴重的立體障礙，並占據部分受質與酵素結合位置，使受質與酵素無法和酵素作適當的結合，因而阻礙受質與 Asp 456 的反應，使得開環反應無法進行，最終導致酵素失去活性。而在 Phe 的取代突變株中，可能是因殘基較 Tyr 和 Trp 小且不帶電荷，所以產生微量的單環或雙環產物，但也無法繼續進行環化反應以形成三環或四環的產物。



《圖 5-7》A. 酵母菌 ERG7^{C457W} 結構模擬圖；B. 酵母菌 ERG7^{C457R} 結構模擬圖

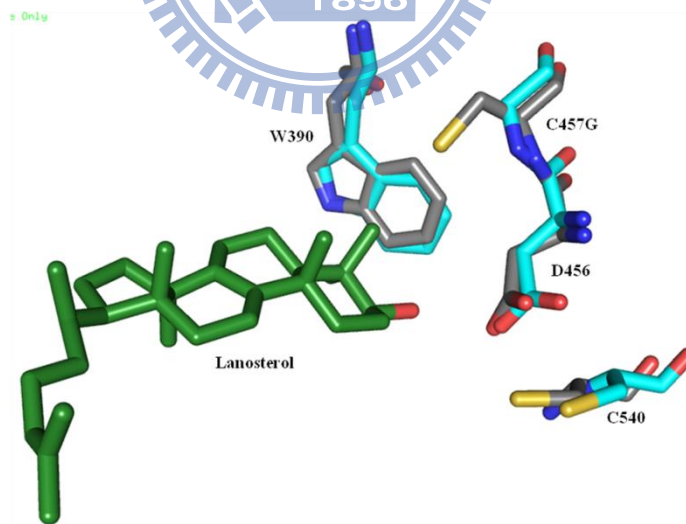
在酸性基團取代中，Asp 的殘基只比 Glu 少了一個碳原子的長度，但兩者的酵素活性卻截然不同。我們利用分子模擬的方式，比較野生型與 ERG7^{C457E} 或 ERG7^{C457D} 兩個突變株的差異，從立體空間上來看，Glu 的殘基和野生型的一樣都指向活性區內，而 Asp 的殘基卻指向九十度角後方，如《圖 5-8》所示。另一方面，突變也影響 Glu460 殘基，其與突變氨基酸 Glu457 和 Asp457 的間距分別為 7.1Å 和 7.8Å；而突變氨基酸 Asp457 與 Asp456 其間距增長為 7.1Å，但野生型的 Cys457 和突變株的 Glu457 與其 Asp456 的距離皆只有 6.3Å。在人類氧化鯊烯-羊毛硬脂醇環化酵素結晶結構中認為 Glu460 具有重新質子化 Asp456 的功能，因此我們推測所突變的酸性基團會和 Asp456 競爭 Glu460，但在 ERG7^{C457D} 突變株中，其 Asp457 卻因位向問題無法補足 Asp456 所失去的功能，而使酵素失去活性。



《圖 5-8》A. 野生型酵母菌 ERG7^{C457} 結構模擬圖；
B. 酵母菌 ERG7^{C457E} 結構模擬圖；C. 酵母菌 ERG7^{C457D} 結構模擬圖

5.2.5.2 ERG7^{C457} 在環化過程所扮演的角色

ERG7^{C457X} 突變株基本上仍都具有酵素活性，只要突變殘基不帶電荷或巨大的立體障礙。在這些具酵素活性的突變點中，只有 ERG7^{C457G} 的主產物不是羊毛硬脂醇，而是單環的 Achilleol A，其和羊毛硬脂醇產物比例約為 3:1。從分子模擬上來看《圖 5-9》，雖然 ERG7^{C457G} 不會造成鄰近氨基酸有明顯的位移或是角度轉變，但卻在酵素活性區空出了原本 -SH (thiol group) 殘基所佔有的空間，這可能讓受質或氨基酸的可變動角度增加，變得較不穩定，而容易在單環脫氫中止反應形成 Achilleol A。Xiong 等人在阿拉伯芥中也發現一種氧化鯊烯環化酵素，可得到雙環和多種單環產物，其基因組 (At5g42600) 的開環序列正是 DGTAE⁵¹。因此我們推測，Cys457 不只利用 -SH 基團固定 Asp456 的位向，並且能利用其本身的空間障礙，進而減小受質可變動的空間，也就能增加受質在酵素活性區域的穩定性，而更有利於 Asp456 開環和後續的環化步驟。



《圖 5-9》酵母菌突變株 ERG7^{C457G} (藍色) 與野生型 ERG7 (灰色) 之空間結構比較

第六章 結論

在整篇論文中，我們利用了丙氨酸掃描法，針對豌豆 PSY 和阿拉伯芥 CAS 的假設活性區氨基酸做定點突變，也用飽和定點突變將酵母菌 ERG7^{C457} 突變成其他 19 種氨基酸，藉由突變產物的分析配合分子模擬結構圖，更進一步探討這些活性區氨基酸在酵素催化機制中所扮演的角色，以及酵素結構與活性的關係。

6.1 利用丙氨酸掃描針對 *Psa*PSY 和 *Ath*CAS 假設活性區氨基酸的結果分析

(1) 在 *Psa*PSY 中，Y259A 與 G369A 單定點突變株即造成酵素失去活性。由電腦分子模擬結果發現，許多活性區內用來穩定高能中間物的芳香族氨基酸，同時受到 Y259A 與 G369A 突變影響，產生角度或是位置上的偏移，而導致酵素失去活性。

(2) 在 *Ath*CAS 中，五個定點突變株 Y118A、L124A、W221A、M254A 和 P367A 會導致酵素失去原本活性。在其分子模擬結果中，也觀察到活性區內一些芳香族氨基酸受定點突變影響而產生偏移現象。

(3) CAS^{H257A} 不具有原酵素活性，而是生成在不同位置脫氫的四環產物 parkeol。當 His 突變成殘基較小的 Ala 時，多出來的空間可能造成受質的浮動增加，再加上 Phe726 的偏移，能進一步穩定 C9/C11 碳陽離子中間物，導致產物脫氫的位置改變，進而生成 parkeol。

(4) 經由分析 pYES2 PSY^{Y259H} 與 pRS314 PSY^{Y259H} 突變株產物證明，豌豆

豆基因 PSY 確實因在酵母菌內的表現量不足，導致我們沒有辦法觀察到一些提早環化結束或是在不同位置脫氫的產物，因此難以對其功能做進一步的分析。但在丙氨酸掃描突變株中，也難以排除因 Ala 基團影響的可能因素。同樣的問題，可能也存在於同為外來基因的 *AthCAS* 中。

6.2 酵母菌 $ERG7^{C457}$ 的功能性分析

(1) 在酵母菌 $ERG7^{C457X}$ 的功能性篩選中，除了芳香族氨基酸 (Phe、Tyr 和 Trp)、帶負電荷氨基酸 (His、Lys 和 Arg) 和酸性基團氨基酸 Asp 突變會使酵素失去活性之外，其它突變株都仍保有野生型 ERG 的酵素活性。

(2) 在 C457F 突變株中，可得到微量的單環和雙環產物，至於其它五個芳香族氨基酸和帶電荷氨基酸突變株：C457Y、C457W、C457H、C457K 和 C457R，皆因其殘基巨大的立體障礙或是基團上所帶的電荷，使受質與酵素無法和酵素作適當的結合，因而阻礙受質與 Asp 456 的反應，使得開環反應無法進行。

(3) 在 C457D 和 C457E 的殘基只差了一個碳鏈的長度，卻導致完全迥異的酵素活性。經電腦模擬發現，這一個碳鏈的差別，導致兩個殘基偏折角度的改變。推測當突變的酸性基團與 Asp456 競爭與 Glu460 反應再質子化時，C457D 因殘基的鏈長與角度的影響，無法互補 Asp456 的功能，而導致酵素完全失去活性。

(4) C457G 突變株中，因 Gly 殘基過小，導致受質或氨基酸的可變動角度增加，變得較不穩定，而得到 75% 的 Achilleol A 與 25% 的羊毛硬脂

醇。

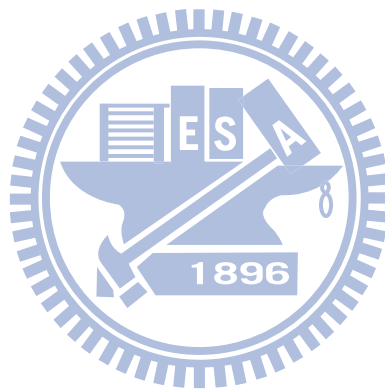
(5) 綜合飽和定點突變株和電腦模擬結果，發現因 Cys457 鄰近開環氨基酸 Asp456，所以容易對於開環反應的成敗有所影響，但只要突變的基團不是具有過分巨大的立體障礙或是帶有電荷的影響，基本上仍都具有酵素活性，可生成羊毛硬脂醇。此外，Cys457 也能利用其本身殘基以減少受質或酵素變動的空間，達到穩定催化反應的功能。



第七章 未來展望

鑑於 pYES2 PSY^{Y259H} 與 pRS314 PSY^{Y259H} 的定點突變株之產物分析的差異，我們發現以酵母菌表現不同物種基因有其缺陷，因此未來可能利用具有高表現量特性之載體攜帶這些非酵母菌基因，改善其表現量不足之缺點，再進一步對不同物種酵素活性區內胺基酸作功能性分析。

另一方面，還有一個我們一直以來努力不懈的方向，就是致力將氧化鯊烯環化酵素進行大量的表現與純化，期望能得到 X-ray 晶體結構或進行酵素動力學實驗，將使我們對於氧化鯊烯環化酵素有更進一步的了解。



參考文獻

- (1) Xu, R.; Fazio, G. C.; Matsuda, S. P. *Phytochemistry* **2004**, *65*, 261-291.
- (2) Allayee, H.; Laffitte, B. A.; Lusic, A. J. *Science* **2000**, *290*, 1209-1211.
- (3) Vance, D. E.; Van den Bosch, H. *Biochim. Biophys. Acta.* **2000**, *1529*, 1-8.
- (4) Simons, K.; Toomre, D. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2000**, *1*, 31-39.
- (5) Schulz-Gasch, T.; Stahl, M. *J Comput Chem* **2003**, *24*, 741-753.
- (6) Woodward, R. B.; Bloch, K. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *75*, 2023-2024.
- (7) Corey, E. J.; Virgil, S. C.; Sarshar, S. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 8171-8172.
- (8) Barton, P. G.; Gunstone, F. D. *J. Biol. Chem.* **1975**, *250*, 4470-4476.
- (9) Barton, D. H.; Jarman, T. R.; Watson, K. C.; Widdowson, D. A.; Boar, R. B.; Damps, K. *J. Chem. Soc. Perkin 1* **1975**, 1134-1138.
- (10) Robinson, H. S. *J. Natl. Med. Assoc.* **1970**, *62*, 474-477.
- (11) Gallivan, J. P.; Dougherty, D. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1999**, *96*, 9459-9464.
- (12) Miklis, P. C.; Ditchfield, R.; Spencer, T. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*.
- (13) Zoltewicz, J. A.; Maier, G. D. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 4985-4990.
- (14) Corey, E. J.; Staas, D. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 3526-3527.
- (15) Corey, E. J.; Cheng, H.; Baker, C. H.; Matsuda, S. P. T.; Li, D.; Song, X. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 1277-1288.
- (16) Van Tamelen, E. E.; Willet, J.; Schwartz, M.; Nadeau, R. *J Am Chem Soc* **1966**, *88*, 5937-5938.
- (17) Segura, M. J. R.; Jackson, B. E.; Matsuda, S. P. T. *Nat. Prod. Rep.* **2003**, *20*, 304-317.
- (18) Wendt, K. U.; Lenhart, A.; Schulz, G. E. *J. Mol. Biol.* **1999**, *286*, 175-187.
- (19) Hess, B. A., Jr. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 10286-10287.
- (20) Hess, B. A., Jr. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 165-167.

- (21) Jenson, C.; Jorgensen, W. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 10846-10854.
- (22) Joubert, B. M.; Hua, L.; Matsuda, S. P. T. *Org. Lett.* **2000**, *2*, 339-341.
- (23) Wu, T. K.; Liu, Y. T.; Chiu, F. H.; Chang, C. H. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 4691-4694.
- (24) Thoma, R.; Schulz-Gasch, T.; D'Arcy, B.; Benz, J.; Aebi, J.; Dehmlow, H.; Hennig, M.; Stihle, M.; Ruf, A. *Nature* **2004**, *432*, 118-122.
- (25) Wu, T. K.; Li, W. H.; Chang, C. H.; Wen, H. Y.; Liu, Y. T.; Chang, Y. C. *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 5731-5737.
- (26) Wendt, K. U. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 3966-3971.
- (27) Corey, E. J.; Virgil, S. C.; Cheng, H.; Hunter Baker, C.; Matsuda, S. P. T.; Singh, V.; Sepehr, S. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 11819-11820.
- (28) Rajamani, R.; Gao, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 12768-12781.
- (29) Abe, I. *Nat. Prod. Rep.* **2007**, *24*, 1311-1331.
- (30) Wu, T. K.; Chang, C. H.; Wen, H. Y.; Liu, Y. T.; Li, W. H.; Wang, T. T.; Shie, W. S. *Org. Lett.* **2010**, *12*, 500-503.
- (31) Wu, T. K.; Wen, H. Y.; Chang, C. H.; Liu, Y. T. *Org. Lett.* **2008**, *10*, 2529-2532.
- (32) Johnson, W. S.; Lindell, S. D.; Steele, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 5852-5853.
- (33) Johnson, W. S.; Telfer, S. J.; Cheng, S.; Schubert, U. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 2517-2518.
- (34) Griffin, R. J.; Stevens, M. F. *Anticancer Drug Des.* **1992**, *7*, 443-449.
- (35) Wu, T. K.; Liu, Y. T.; Chang, C. H. *ChemBiochem* **2005**, *6*, 1177-1181.
- (36) Wu, T. K.; Liu, Y. T.; Chang, C. H.; Yu, M. T.; Wang, H. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 6414-6419.
- (37) Wu, T. K.; Chang, C. H. *ChemBiochem* **2004**, *5*, 1712-1715.
- (38) Lodeiro, S.; Wilson, W. K.; Shan, H.; Matsuda, S. P. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 439-442.
- (39) Lodeiro, S.; Segura, M. J.; Stahl, M.; Schulz-Gasch, T.; Matsuda, S. P.

- Chembiochem* **2004**, *5*, 1581-1585.
- (40) Lodeiro, S.; Schulz-Gasch, T.; Matsuda, S. P. T. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 14132-14133.
- (41) Suzuki, M.; Xiang, T.; Ohyama, K.; Seki, H.; Saito, K.; Muranaka, T.; Hayashi, H.; Katsube, Y.; Kushiro, T.; Shibuya, M.; Ebizuka, Y. *Plant Cell Physiol.* **2006**, *47*, 565-571.
- (42) Wendt, K. U.; Poralla, K.; Schulz, G. E. *Science* **1997**, *277*, 1811-1815.
- (43) Ourisson, G.; Rohmer, M.; Poralla, K. *Annu. Rev. Microbiol.* **1987**, *41*, 301-333.
- (44) Rohmer, M.; Bouvier, P.; Ourisson, G. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1979**, *76*, 847-851.
- (45) Caspi, E. *Acc Chem Res* **1980**, *13*, 97-104.
- (46) Abe, I.; Zheng, Y. F.; Prestwich, G. D. *Biochemistry* **1998**, *37*, 5779-5784.
- (47) Dang, T.; Abe, I.; Zheng, Y. F.; Prestwich, G. D. *Chem. Biol.* **1999**, *6*, 333-341.
- (48) Merkofer, T.; Pale-Grosdemange, C.; Wendt, K. U.; Rohmer, M.; Poralla, K. *Tetra. Lett.* **1999**, *40*.
- (49) Kushiro, T.; Shibuya, M.; Masuda, K.; Ebizuka, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 6816-6824.
- (50) Dang, T.; Prestwich, G. D. *Chem. Biol.* **2000**, *7*, 643-649.
- (51) Xiong, Q.; Wilson, W. K.; Matsuda, S. P. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2006**, *45*, 1285-1288.

附錄一 利用桿狀病毒於昆蟲細胞中表現酵母菌氧化鯊烯-羊毛硬脂醇環化酵素

桿狀病毒表現載體系統屬於真核細胞表現系統，目前已成功的表現多種不同的蛋白，所以桿狀病毒載體系統在外源蛋白之量產上有十分重大的貢獻。與其他外源蛋白表現系統的比較，可發現桿狀病毒表現載體系統可平衡其他各表現系統的優缺點，為一適當的外源蛋白表現系統。以下歸納利用桿狀病毒表現載體來生產外源蛋白之優點：

一、高效率表現

由於桿狀病毒基因擁有特別強的啟動子能高效率地啟動外源基因的表現，使它的外源蛋白產量甚高。另該病毒具較大的基因組約 100 百萬道頓 (dalton)，故可以容納插入近 10kbp 大的外源基因片段。

二、表現多樣性蛋白

能完成蛋白質轉錄後的加工修飾，其中包括糖基化、磷酸化等。此蛋白質修飾後的作用也比細菌、酵母菌表現系統佳，且具有切除訊息蛋白序列 (signal peptide) 的作用，使蛋白質能做正確的折疊。

三、具經濟上的效益

從製作到生產所需的時間及經費遠比動物或植物系統低，因此預期此桿狀病毒在生產外源蛋白上較具有經濟上的效益。

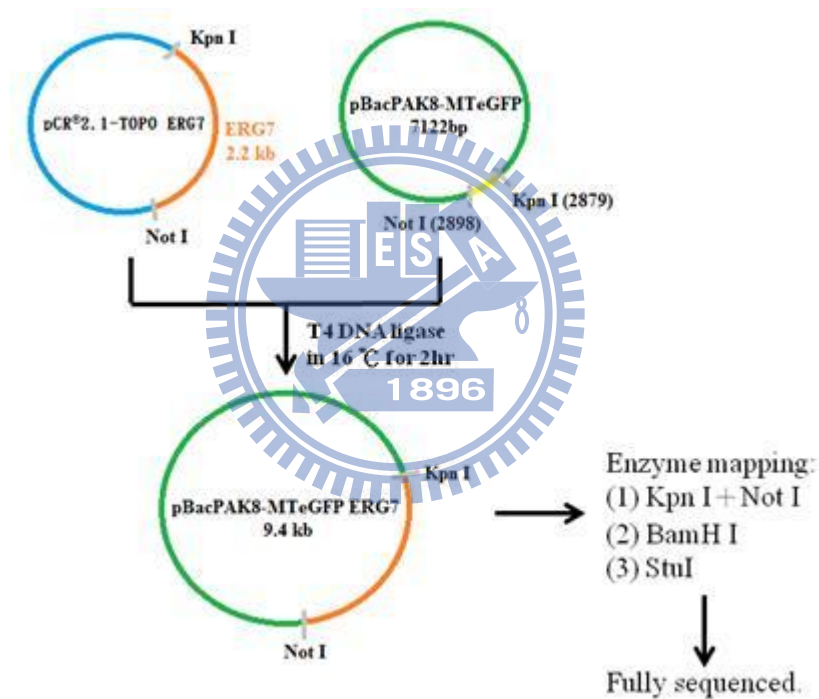
四、安全性

昆蟲重組桿狀病毒被認為是遺傳學上安全的表現載體，已被用來研發與疫苗有關的蛋白抗原表現。

利用桿狀病毒載體系統攜帶外源蛋白基因不但具備完善性，同時也具備極佳的應用性。因此，我們選用此方表現酵母菌氧化鯊烯-羊毛硬脂醇環化酵素，並以同時表現人類肌肽酶 (carnosinase) 作為對照組。

pBacPAK8-MTeGFP ERG7 質體建構

首先用限制酶 Kpn I 和 Not I 將酵母菌 (*S. cerevisiae*) 的氧化鯊烯-羊毛硬脂醇環化酵素基因 ERG7 從載體 pCR[®] 2.1-TOPO 上剪切下，置換到另一載體 pBacPAK8-MTeGFP (載體 pBacPAK8 經修飾，外加金屬硫蛋白基因 metallothionein 和綠螢光基因 eGFP) 中，再分別以三組酵素：Kpn I + Not I、BamH I，以及 Stu I 進行鑑定，經酵素鑑定片段大小皆正確無誤的質體，再送定序，實驗流程如《附錄圖 1-1》所示。經定序結果發現，Ser147 突變為 Pro，而其他位置氨基酸皆確認無誤。

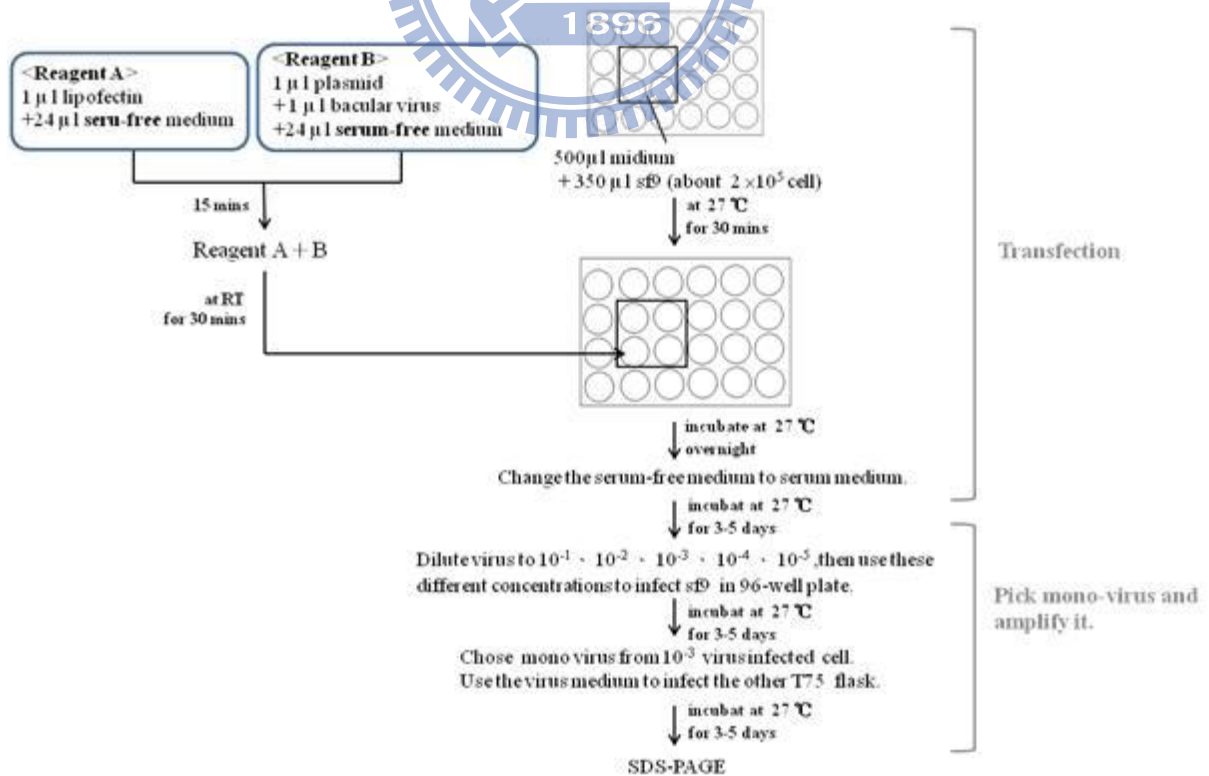


《附錄圖 1-1》pBacPAK8-MTeGFP ERG7 質體建構流程圖

桿狀病毒表現系統表現酵母菌氧化鯊烯-羊毛硬脂醇環化酵素

將昆蟲細胞 (*Spodoptera frugiperda*, Sf9 cells) 解凍後，以培養液洗去其內的抗凍劑 (DMSO)，再培養於含有 10% 胎牛血清 (FBS) 的培養液 (Grace's insect medium) 中約二至三天。待細胞長到足夠數量，將其分裝在 24 孔盤中，每孔的細胞量約 2×10^5 ，靜置 2 小時等待細胞貼附。以桿狀

病毒轉染 (transfection) 之前，須先備製試劑 A 與試劑 B，試劑 A 為 1 μl 微脂體 (lipofectin) 混合 24 μl 不含血清的培養液，試劑 B 為 1 μl 重組載體 (pBacPAK8-MTeGFP ERG7 或 pBacPAK8-MTeGFP hCN1) 與 1 μl 桿狀病毒 (linearized baculoviral DNA) 混合在 23 μl 不含血清的培養液中。試劑 A 與試劑 B 先各別靜置 15 分鐘，將兩試劑混合在一起後，於室溫下再靜置 30 分鐘。之後，將試劑 A 加 B 與 150 μl 不含血清的培養液混合，再加入孔盤中轉染 Sf9 細胞，並在 27°C 培養箱中培養約四天。四天後的細胞培養液含有大量帶有鯊烯-羊毛硬脂醇環化酵素之桿狀病毒，以 96 孔盤將此培養液稀釋成 10^{-1} ~ 10^{-5} 不同濃度，取 100 μl 不同濃度之桿狀病毒液感染每孔 Sf9 細胞量約 4×10^4 的 96 孔盤，於 27°C 培養箱中再培養約四天後，利用螢光顯微鏡挑選單一桿狀病毒表現 (即單一螢光表現)。此單一帶有鯊烯-羊毛硬脂醇環化酵素之桿狀病毒，再以 Sf9 細胞放大，實驗流程如《附錄圖 1-2》所示。

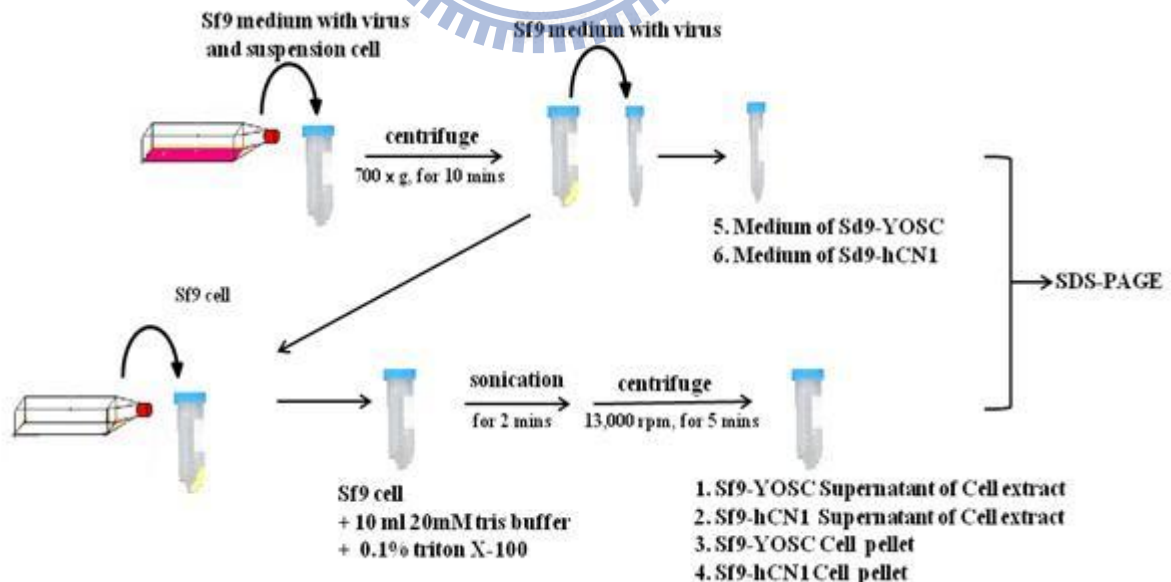


《附錄圖 1-2》桿狀病毒感染昆蟲細胞之流程圖

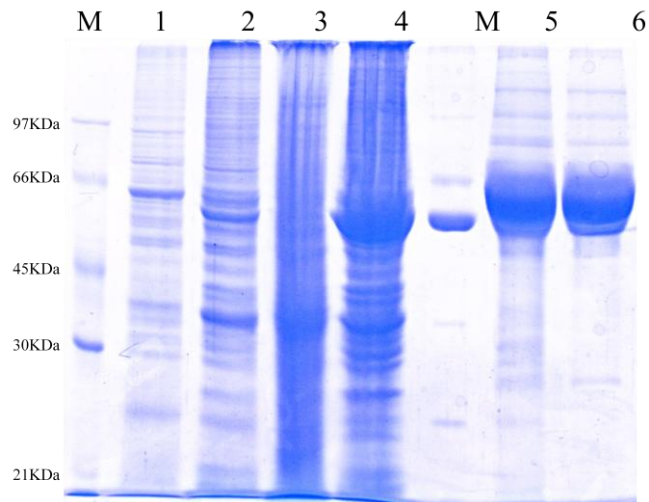
除了 Sf9 細胞株外，另一株能高度表現蛋白的昆蟲細胞株 BTI-TN-5B-4 (High 5) 也用於本次的表現實驗中，其培養液 (High 5 medium) 和 Sf9 細胞株的培養液不同，且須額外添加 10% L-Glutamine。High 5 表現蛋白質的實驗步驟與 Sf9 細胞株相同，將先前感染 Sf9 細胞株取得的桿狀病毒感染 High 5 細胞株，放大桿狀病毒之表現即可。

蛋白質表現結果

依照圖《附錄圖 1-3》所示之流程，將表現的細胞株分成含有桿狀病毒之細胞培養液和細胞震盪離心後的上清液 (supernatant) 和細胞殘骸 (cell pellet) 三部分，進行電泳分析。但是在 SDS-PAGE 上，表現酵母菌氧化黨烯環化酵素的 Sf9 細胞株與對照組相互比較之下，在 66 kDa ~ 97 kDa 間，沒有看到特表現量別突出的蛋白質，而在對照組中，確實有人類肌肽酶 (hCN1) 表現《附錄圖 1-4》，大小約為 55 kDa；而蛋白質在 High Five™ 的表現結果和 Sf9 細胞株結果相同《附錄圖 1-5》。

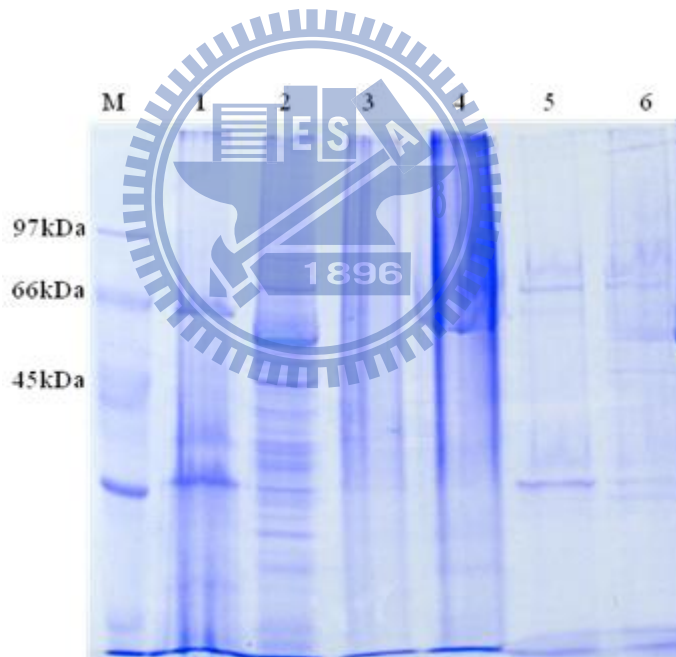


《附錄圖 1-3》電泳分析之樣品備製



《附錄圖 1-4》酵母菌氧化鯊烯-羊毛硬脂醇環化酵素在 Sf9 細胞株的表現結果

- 1：表現 YOSC 細胞之細胞萃取上清液； 2：表現 hCN1 細胞之細胞萃取上清液；
 3：表現 YOSC 細胞之細胞殘骸； 4：表現 hCN1 細胞之細胞殘骸；
 5：表現 YOSC 細胞之培養液； 6：表現 hCN1 細胞之培養液。



《附錄圖 1-5》酵母菌氧化鯊烯-羊毛硬脂醇環化酵素在 High 5 細胞株的表現結果

- 1：表現 YOSC 細胞之細胞萃取上清液； 2：表現 hCN1 細胞之細胞萃取上清液；
 3：表現 YOSC 細胞之細胞殘骸； 4：表現 hCN1 細胞之細胞殘骸；
 5：表現 YOSC 細胞之培養液； 6：表現 hCN1 細胞之培養液。

附錄二 實驗藥品和儀器

1. 實驗藥品與材料

無水醋酸 (Acetic anhydride)

腺嘌呤 (Adenine)

青黴素 (Ampicillin)

D-山梨醇 (D-Sorbitol)

麥角固醇 (Ergosterol)

葡萄糖 (Glucose)

組氨酸 (Histidine)

離氨酸 (Lysine)

甲硫氨酸 (Methioine)

吡啶 (Pyridine)

色氨酸 (Tryptophan)

尿嘧啶 (Uracil)

以上皆購自於 Sigma



冰醋酸 (Acetic acid)

丙酮 (Acetone)

95% 乙醇 (95% Ethanol)

茴香醛 (Anisaldehyde)

二氯甲烷 (Dichloromethane)

乙酸乙酯 (Ethyl acetate)

乙烯二胺四乙酸 (Ethylenediamine-tetraacetic acid ,EDTA)

乙醚 (Ether)

丙三醇 (Glycerol)

氯化血紅素 (Hemin Chloride)

正己烷 (Hexane)

甲醇 (Methanol)

氫氧化鉀 (Potassium hydroxide)

鄰苯三酚 (Pyrogallol)

海沙 (Sea sand)

矽膠 (Silica gel)

硝酸銀 (Silver nitrate)

硫酸鈉 (Sodium sulfate)

有機磺酸 (Sulfonic Acid)

薄層色層分析平板 (TLC plate)

聚山梨醇酯 (Tween 80)

以上皆購自於 Merck

洋菜膠 (Agarose-LE)

溴酚藍 (Bromophenol blue)

三羥甲基氨基甲烷 (Tris base)

以上皆購自於 USB

洋菜 (Bacto™ Agar)

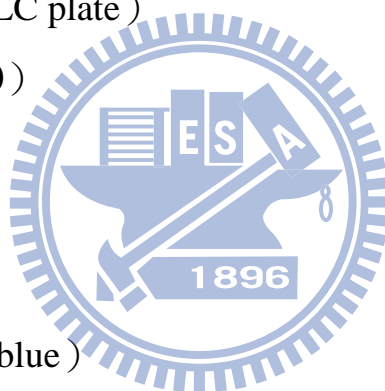
LB 培養基 (LB Broth, Miller)

胰化蛋白 (Tryptone)

酵母菌專用培養基 (Difco™ YPD Broth)

酵母菌專用培養基 (Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acid)

以上皆購自於啟新生技 (CMP)



DNA 10Kb Ladder

引子 (Primers)

以上皆購自於 Bio Basic Inc., Canada

G418

Sf9 細胞株專用培養粉末 (Grace's insect medium)

High 5 細胞株專用培養液 (EXPRESS FIVE® Serum Free Medium)

左旋麩醯胺酸 (L-Glutamine)

以上皆購自於 Gibco

二甲基亞砜 (Dimethyl sulfoxide, DMSO) 購自於 MP Biomedicals

脫氧核糖核苷酸組 (dNTP Set, 100mM Solutions) 購自於 GE Healthcare

限制酶 (Restriction enzyme) 購自於 New England BioLabs Inc.

SYBR® Green I 購自於 Roche

微脂體 (lipofectin) 購自於 Invitrogen

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

3. 菌株、細胞株、載體與病毒

載體 pRS313 :

購自於 New England BioLabs。載體 pRS313 是一種可穿梭於酵母菌 *S. cerevisiae* 和大腸桿菌 *E. coli* 間的載體，帶有選擇性標記 *His3*。

載體 pRS314：

購自於 New England BioLabs。載體 pRS314 是一種可穿梭於酵母菌 *S. cerevisiae* 和大腸桿菌 *E. coli* 間的載體，帶有選擇性標記 *Trp1*。

載體 pYES2：

購自於 Invitrogen。載體 pYES2 是一種可穿梭於酵母菌 *S. cerevisiae* 和大腸桿菌 *E. coli* 間的載體，帶有選擇性標記 *Ura3*。

載體 pBacPAK8：

購自於 BD。載體 pBacPAK8 再經修飾，外加金屬硫蛋白基因 (metallothionein) 和綠螢光基因 (eGFP)，修飾完成之載體名為 pBacPAK8-MTeGFP。

XL1-Blue：

為大腸桿菌 *E. coli* 之一株，購自於 Stratagene，再自行培養放大：

取少許 XL1-Blue 在含有 Tetracycline (100 mg/L) 的 LB 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 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。

TKW14c2：

亦為酵母菌 *S. cerevisiae* 之菌株其基因型為 MATa (MATa *ERG7Δ::LEU2 ade2-101 his3-Δ200 leu2-Δ1 lys2-801 trp1-Δ63 ura3-52 hem1Δ::Kan^R*)，

可供菌珠選殖篩選用。

***Spodoptera frugiperda* (Sf9) :**

為昆蟲細胞株，購自於 American Type Culture Collection。

BTI-TN-5B-4 (High 5) :

為昆蟲細胞株，購自於 American Type Culture Collection。

Lineaied baculoviral DNA 購自於 BD。

4. 培養液與緩衝液

G418 stock solution (1g/mL)

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

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 °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。

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。

5X sequencing buffer

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

LB medium

25 g 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

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

YNB medium

0.67 g Yeast nitrogen base 溶解於 100 ml 的一次水中經高壓滅菌後儲存於常溫。

YPD medium

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

1M sorbitol solution

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

50X Amino acid solution

因應不同載體所需添加之氨基酸溶液，如：50X ALTHMU、50X ALTHM、50 X ALTMU、ALHMU 等，依不同百分比將所需之氨基酸溶解於一次水，經高壓滅菌後儲存於 4°C。0.2% Adenine，0.3% Lysine，0.2% Tryptophan，0.2% Histidine，0.2% Methonine，0.2% Uracil。

Hemin chloride solution

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

Ergosterol solution

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

Glucose/Amino acid/ Hemin Chloride /Ergosterol plate

將 0.67 g yeast nitrogen base 與 2 g Bacto™ Agar 溶解於 100 ml 的一次水中，經高壓滅菌後加入 4 ml 50% Glucose solution、2 ml 50X amino acid

solution、2 ml Hemin Chloride solution 與 2 ml Ergosterol supplement solution，於無菌環境下混合均勻後倒入培養皿中待其凝固，避光保存於 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。

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 比例混合。

Sf9 細胞株專用培養液 (Grace's insect medium)

一包 Grace's insect medium 粉末容於 900 ml 二次水，外加 0.35 g 的碳酸氫鈉，再將 pH 值調至 6.2。在無菌環境下加入 10% FBS 和 1% Penicillin-Streptomycin 後，再以 0.22 μm 過濾杯去除雜質，保存於 4°C。

High 5 細胞株專用培養液 (EXPRESS FIVE® Serum Free Medium)

在無菌環境下加入 10% L-Glutamine 和 1% Penicillin-Streptomycin，保存於 4°C。

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-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)

