

國立交通大學

生物科技研究所 碩士論文

利用定點飽和突變技術對於酵母菌氧化鯊烯環化酵素中
Gly383及Thr384進行功能性分析並藉由表現之蒺藜苜蓿轉

糖酵素對三萜類化合物進行糖基衍生化之研究



**Functional Analysis of Glycine-383 and Threonine-384
within Oxidosqualene-lanosterol Cyclase from
Saccharomyces Cerevisiae by Site-Saturated Mutagenesis
and Expressed *Medicago Truncatula* Glucosyltransferases
for Triterpenes Glycosylation**

研究生：陳怡臻

指導教授：吳東昆 博士

中華民國 一 00 年 7 月

利用定點飽和突變技術對於酵母菌氧化鯊烯環化酵素中Gly383及
Thr384進行功能性分析並藉由表現之蒺藜苜蓿轉醣酵素對三萜類化
合物進行醣基衍生化之研究

**Functional Analysis of Glycine-383 and Threonine-384 within
Oxidosqualene-lanosterol Cyclase from *Saccharomyces Cerevisiae* by
Site-Saturated Mutagenesis and Expressed *Medicago Truncatula*
Glucosyltransferases for Triterpenes Glycosylation**

研究生：陳怡臻

Student: Yi-Chen Chen

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, 2011
Hsinchu, Taiwan, Republic of China

中華民國一〇〇年七月

利用定點飽和突變技術對於酵母菌氧化鯊烯環化酵素中
Gly383及Thr384進行功能性分析並藉由表現之蒺藜苜蓿轉
醣酵素對三萜類化合物進行醣基衍生化之研究

學生：陳怡臻

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



在酵母菌以及哺乳類動物中，氧化鯊烯環化酵素(ERG7或OSC)催化直鏈狀的氧化鯊烯((3S)-2,3-oxidosqualene)進行環化/重組反應而產生羊毛硬脂醇。在不同的生物物種中，像是動物、真菌和植物會藉由不同的環化酵素和反應機制形成不同的產物。這個複雜的環化/重組反應機制，包含了氧化鯊烯上的環氧基(epoxide)被質子化而起始環化反應，以及一連串的氫化基、甲基的重組和最後高度專一性的去質子化步驟。根據先前的研究，在環化酵素中對於活性區域及立體化學結構具有重要影響的胺基酸進行突變，可以得到單環、三環和四環等多樣性固醇類產物。為了更進一步瞭解其他關鍵胺基酸對於OSC在環化過程及反應機制所扮演的角色，利用飽和定點突變的方式，分析存在於酵素假設活性區中的相對應胺基酸，Gly383 及 Thr384。在

ERG7^{T384X} 和 ERG7^{G383X} 突變株中，分離出許多四環和三環產物，包括 parkeol、9 β -lanosta-7,24-dien-3 β -ol、protosta-16,24-dien-3 β -ol 和 (13 α H)-isomalabarica-14(26),17,21-trien-3 β -ol 等。而藉由酵素結構模擬圖我們也注意到 Gly383 和 Thr384 位在受質 C-17 原脂醇碳陽離子旁的環狀區域 (loop) 上。Gly383 和 Thr384 對於穩定 C-14 和 C-17 原脂醇碳陽離子，以及最後脫氫反應的 C8 / C-9 碳陽離子中間物似乎扮演重要的角色，對這兩個胺基酸進行突變可能會對酵素活性區域的結構及環化/重組反應造成影響，而得到這些非專一性的多樣性產物。

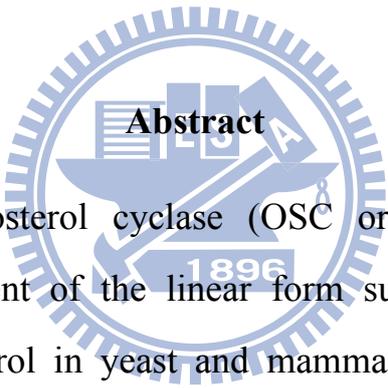
三萜皂苷是一群具有相似化學結構的多樣性產物，由三萜皂苷配基和糖基所組成，為分布於高等植物中的二級代謝產物且多方面的生物活性可被廣泛應用。大部分的三萜皂苷其 C-3 上的 OH 基都接有糖基或糖鏈，而此結構也被認為是其具有生物活性的關鍵。在利用定點突變研究氧化鯊烯環化酵素重排和環化機制的實驗當中，分離出許多四環的中間物及脫氫位置不同的產物，為了使這些產物有更多的應用性。我們合成出由蒺藜苜蓿所分離出的轉糖酵素基因-UGT73K1，並得到大小為 52-kDa 的蛋白質。未來希望將氧化鯊烯環化酵素的突變產物作為此轉糖酵素的受質，在其 C-3 上的 OH 基接上糖基並作相關的活性測試，使此多樣性產物能有廣泛的生物活性，也期盼在生物製藥方面有進一步的發展。

**Functional Analysis of Glycine-383 and Threonine-384
within Oxidosqualene-lanosterol Cyclase from
Saccharomyces Cerevisiae by Site-Saturated Mutagenesis
and Expressed *Medicago Truncatula* Glucosyltransferases
for Triterpenes Glycosylation**

Student: Yi-Chen Chen

Advisor: Dr. Tung-Kung Wu

Institute of National Chiao Tung University



Abstract

Oxidosqualene-lanosterol cyclase (OSC or ERG7) catalyzes the cyclization/rearrangement of the linear form substrate, oxidosqualene, into tetracyclic lanosterol in yeast and mammals. Different species of organisms including *S. cerevisiae* OSC, *A. thaliana* CAS and *P. sativum* PSY operate through different conformational intermediates within the oxidosqualene cyclization process. The postulated cyclization/rearrangement reaction encompasses an acid-catalyzed epoxide protonation, consecutive cationic/ π interaction-directed tetracyclic ring cyclizations, hydrides or methyl groups rearrangement, and a final highly specific deprotonation step. According to previous reports, the mutated OSC produced diverse product profiles ranging from mono- to polycyclic triterpene alcohols by utilizing the diverse structural and stereochemical control in various catalytically important residues

mutant. In order to further illustrate other critical amino acids involved in the catalytic significance and/or enzymatic plasticity of OSC, site-saturated mutagenesis experiments were carried out on the Gly383 and Thr384 of ERG7 to investigate their functional roles in the oxidosqualene cyclization/rearrangement reaction. Various tetracyclic or tricyclic truncated products, including parkeol, 9 β -lanosta-7,24-dien-3 β -ol, protosta-16,24-dien-3 β -ol, and (13 α H)-isomalabarica-14(26),17,21-trien-3 β -ol were isolated from the ERG7^{T384X} and ERG7^{G383X} mutants. In parallel, we also observed that the Gly383 and Thr384 are located on the loop of ERG7 below the C-17 protosteryl cation from the examination of homology models. These results indicated that the Gly383 and Thr384 residues may play an important role in stabilizing C-17 and C-14 protosteryl cation as well as the final C-9 lanosteryl cationic intermediate. The mutated substitution in these two residues, Gly383 and Thr384, may affect the structure of protein active site that interfere the cyclization/rearrangement reaction cascade and thus resulted in the generation of the altered cyclized/deprotonated product.

Triterpene saponins are a group of diverse compounds with a similar chemical structure, consisting of a triterpene aglycone and sugars moiety. They are a class of plant natural products with a wide range of bioactivities. The presence of a sugar chain attached to the aglycone at its C-3 hydroxyl position is the common feature shared by all saponins and also a critical factor influencing the biological activity of many saponins. In order to further functionalize the isolated intermediate structures

among the putative OS-cyclization/rearrangement cascades from various ERG7 mutants and subject them for the application of pharmaceutical field in future. We try to attach a sugar moiety to the C-3 hydroxyl position of tetracyclic products in ERG7 mutants. Herein, we first obtained one glucosyltransferase gene, UGT73K1, from *Medicago truncatula* and expressed it with predict molecular mass about 52-kDa, revealed by a SDS-PAGE. In the future, various OSC mutants' products will be substrates of UGT73K1, and apply these structural derivatives for various bioactivity analyses.



謝誌

不知該如何提筆的開頭，在這瞬間很多回憶畫面不斷浮現在腦海，於是兩年就這樣過了，感謝大家的陪伴，這段帶有歡笑、感動與充實的日子。

謝謝我的指導教授吳東昆老師，提供一個非常完善的實驗環境讓我們能夠無憂無慮專心在自己的研究，除了實驗上的指導，您總是默默的關心和擔心我們，能進入這樣溫馨和諧的大家庭，真的很幸運也很謝謝老師。

感謝口試委員李耀坤老師和李宗璘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。

感謝實驗室最亮的光明燈—翔哥，謝謝你抽空幫我修改論文，帶我認識了許多實驗上相關的背景資料；感謝媛婷學姊這兩年總是帶著笑容和耐心與我討論實驗，給予最大的支持和鼓勵陪我們度過難關；感謝裕國學長在蛋白質實驗上給我很多建議和幫忙；感謝實驗室儀器的守護神—豪哥，謝謝你不辭辛勞維持和看管實驗室大大小小的儀器，還有環安相關的工作；感謝晉源學長指導我關於蛋白質表現和純化的實驗，以及幫我們解決很多關於電腦模擬的操作問題；感謝文鴻學長，雖然與你見面的時間不多，但每次跟你聊天都很愉快，瘦體脂大作戰一起加油吧；Thank you, Mili. I'll always miss your India food.；感謝紅姊這兩年的照顧，博愛校區實驗室有你在就會讓人覺得很安心，我要給你一個大擁抱；感謝一直不斷發 paper 的 Allen 從不吝嗇與我們分享你的喜悅；感謝天昶學長、奕齊學長和靜婷學姊帶我認識 OSC，不管在實驗上還是生活上也都給我很多的幫助；感謝好夥伴們—欣怡、欣芳和世穎，這兩年不管是高興還是悲傷有你們的陪伴真好，一起籌劃的活動和旅行都是非常美好的回憶；感謝學弟妹孟兒、婉婷、欣樺和富生，以及新進學弟妹和專題生們，謝謝你們分擔實驗室庶務也帶

來了活力與歡樂。

最後要感謝我親愛的家人：爸爸、媽媽和姊姊，謝謝你們給我依靠和支持，有你們我真的很幸福；還有一路陪我走到現在的好哥兒們、好姊妹們，謝謝你們陪我談心、散心和傾聽自己的心。

祝福所有愛我和我愛的人都能夠帶著微笑度過每一天，事事順利和快樂幸福。再次感謝大家！



目錄

中文摘要.....	I
英文摘要.....	III
謝誌.....	VI
目錄.....	VIII
表目錄.....	XII
圖目錄.....	XIII
第一章 序論.....	1
1.1 氧化鯊烯環化酵素簡介.....	1
1.1.1 氧化鯊烯的結構與其環化機制.....	6
1.2 氧化鯊烯環化酵素探討.....	9
1.2.1 人類氧化鯊烯-羊毛硬脂醇環化酵素.....	9
1.2.2 氧化鯊烯-羊毛硬脂醇環化酵素.....	10
1.2.3 氧化鯊烯-羊毛硬脂醇環化酵素反應機制.....	11
1.2.3.1 開環起始反應和 A 環的形成.....	12
1.2.3.2 環化過程和受質穩定之假說.....	14
1.2.3.3 骨架重排與脫氫反應.....	20
1.2.4 氧化鯊烯-環阿屯醇環化酵素.....	22

1.2.5 氧化鯊烯-香桂素與氧化鯊烯-羽扇醇合成酵素	26
1.3 皂苷簡介	28
1.3.1 皂苷的生物活性	30
1.3.2 皂苷生合成探討	32
1.4 研究目的	35
1.4.1 對氧化鯊烯環化酵素進行定點飽和突變	36
1.4.2 將 OSC 突變產物應用於轉醣酵素	43
第二章 實驗方法	46
2.1 對酵母菌 ERG7 進行定點飽和突變	46
2.1.1 重組質體的建構	47
2.1.2 酵母菌株 TKW14C2 的電穿孔作用	53
2.1.3 功能性補充篩選	55
2.1.4 酵母菌的培養	55
2.1.5 非皂化脂質的萃取	56
2.1.6 管柱液相色層分析	56
2.1.7 薄層色層分析	57
2.1.8 氣相層析-質譜儀 (GC-MS) 的條件	58
2.1.9 突變電腦模擬圖的建構	58
2.2 蒺藜苜蓿 (<i>Medicago truncatula</i>) 之轉醣酵素 UGT3K1	59

2.2.1 合成 UGT73K1 基因序列	59
2.2.2 質體 DNA 的放大與酵素鑑定	61
2.2.3 建構表現質體	61
2.2.4 重組質體於大腸桿菌之表現	62
2.2.5 金屬離子親和性管柱層析	63
2.2.6 蛋白質的分子量與純度分析	63
2.2.7 蛋白質濃度測量	64
第三章 實驗結果與討論	66
3.1 酵母菌 ERG7 ^{G383X} 與 ERG7 ^{T384X} 功能性分析	66
3.1.1 建構 ERG7 ^{G383X} 與 ERG7 ^{T384X} 的定點飽和突變株	66
3.1.2 ERG7 ^{G383X} 與 ERG7 ^{T384X} 突變株功能性補充篩選	66
3.1.3 ERG7 ^{G383X} 與 ERG7 ^{T384X} 突變株產物分析	68
3.1.4 ERG7 ^{G383X} 與 ERG7 ^{T384X} 突變株電腦模擬分析	71
3.1.4.1 ERG7 ^{G383} 與受質間的關係	73
3.1.4.2 ERG7 ^{G383X} 環化過程及生合成途徑推測	76
3.1.4.3 ERG7 ^{T384} 用極性和非極性胺基酸取代的差異	79
3.1.4.4 ERG7 ^{T384X} 環化過程及生合成途徑推測	84
3.1.4.5 ERG7 ^{G383} 與 ERG7 ^{T384} 在環化過程所扮演的角色	87
3.2 轉醣酵素 UGT73K1 之取得	88

3.2.1 對 UGT73K1 合成序列之洋菜膠電泳檢驗	88
3.2.2 表現質體之構築與確認	89
3.2.3 重組基因在大腸桿菌之表現	90
3.2.4 利用基質輔助雷射脫附質譜儀對UGT73K1作確認.....	91
3.2.5 利用酵素耦合對UGT73K1進行活性測試.....	93
3.2.6 皂苷轉醣酵素胺基酸序列比對	95
第四章 結論與未來展望	99
4.1 酵母菌ERG7 ^{G383} 和ERG7 ^{T384} 功能性分析	99
4.2 轉醣酵素UGT73K1的取得	103
第五章 參考文獻	105



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	25
《表 2-1》酵母菌 $ERG7^{G383X}$ 定點飽和突變之引子設計	49
《表 2-2》酵母菌 $ERG7^{T384X}$ 定點飽和突變之引子設計	49
《表 2-3》QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit 之材料條件	50
《表 2-4》QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit 之聚合酶連鎖 反應條件	50
《表 2-5》 <i>DpnI</i> 切除 PCR 產物 DNA 母股之條件	51
《表 2-6》特定限制酶鑑定之材料條件	52
《表 2-7》BigDye [®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit 所用之材 料	53
《表 2-8》12.5 % separating gel (上) 及 5 % stacking gel (下) 電 泳膠片的配方	64
《表 3-1》酵母菌 $ERG7^{G383X}$ 功能性篩選	67
《表 3-2》酵母菌 $ERG7^{T384X}$ 功能性篩選	68
《表 3-3》酵母菌 $ERG7^{G383X}$ 的產物分析表	70
《表 3-4》酵母菌 $ERG7^{T384X}$ 的產物分析表	71

圖目錄

《圖 1-1》三萜類環化酵素在不同物種間的產物專一性和多樣性.....	2
《圖1-2》固醇類生合成途徑.....	4
《圖1-3》氧化鯊烯在酵素內的摺疊方式與其產物.....	8
《圖1-4》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時的反應活性位置.....	10
《圖1-5》氧化鯊烯-羊毛硬脂醇環化酵素之環化機制.....	12
《圖 1-6》酵母菌 ERG7 假設開環環化機制.....	13
《圖 1-7》人類 OSC 開環環化機制.....	14
《圖 1-8》Trp387、Phe444 與 Trp581 能穩定 A 環與 B 環形成時 C-6、C-10 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.....	16
《圖 1-9》利用類似物作為受質結果顯示 C 環會先形成五圓環.....	17
《圖 1-10》Hess 認為 C 環與 D 環會經由過度態 10 同時形成.....	18
《圖 1-11》Johnson 提出的理論模型 Johnson Model.....	19
《圖 1-12》Griffin 所提出的 Aromatic Hypothesis 理論模組.....	20
《圖1-13》具有高度保留性的芳香族胺基酸可以利用碳陽離子與 π 電子共振交互作用去穩定甲基與氫化基的骨架轉移重 排.....	21

《圖 1-14》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.....	21
《圖1-15》 Tyr410 (◆)、His477 (*) 與Ile481 (▼) 在CAS1高度保留，而在ERG7中則被Thr、Cys、Gln及Val所取代.....	23
《圖 1-16》氧化鯊烯-環阿屯醇環化酵素中 Tyr410、His477 與 Ile481 的相對位置.....	24
《圖1-17》 酵素催化氧化鯊烯形成達瑪烯碳陽離子及原脂醇碳陽離子中間物.....	26
《圖 1-18》 皂苷配基的典型骨架結構，(A)、(B) 為固醇皂苷，(C) 為三萜皂苷，R 為糖基.....	29
《圖 1-19》 lotoidoside D (1) 和 lotoidoside E (2) 在低濃度下對於 HeLa cell 也有很好的抑制活性.....	31
《圖 1-20》 3-O-β-D-glucuronopyranosyl-quillaic acid 對於治療 HIV、瘧疾和腫瘤之疫苗具有作為佐劑的潛力.....	31
《圖 1-21》 11 種主要皂苷配基骨架.....	33
《圖 1-22》 由 β-香桂素衍伸而來的皂苷產物，以及已被定義的轉糖酵素 UGT74M1、CYP93E1、UGT71G1、UGT73K1...	35

《圖1-23》本實驗室目前已得到在C-17cation位置脫氫的 新產物.....	38
《圖1-24》酵母菌ERG7活性區域中C-17 cation位置及其鄰近 之胺基酸.....	39
《圖 1-25》 G383 與 T384 在 CAS 和 ERG7 各物種間的序列比對.	40
《圖1-26》人類OSC與膜結合時的構形，圖中黑色為抑制劑 Ro48-8071 結合在活性區域的反應中心，透明網狀 的部分為受質進出酵素的通道.....	42
《圖 1-27》酵母菌 ERG7 的蛋白質結構，圈起來的部分為 Gly383 和 Thr384 所在位置.....	42
《圖 1-28》 UGT73K1 在蒺藜苜蓿中的簡略生合成途徑.....	45
《圖 2-1》實驗流程圖.....	46
《圖 2-2》 QuikChange Site-Directed Mutagenesis 示意圖.....	48
《圖 3-1》野生型酵母菌 ERG7 ^{G383} 和 ERG7 ^{T384} 與附近胺基酸之 結構模擬圖.....	72
《圖 3-2》酵母菌 ERG7 ^{G383D} 結構模擬圖，野生型 ERG7 結構 以綠色表示.....	74
《圖 3-3》酵母菌 ERG7 ^{G383N} 結構模擬圖，野生型 ERG7 結構 以綠色表示.....	75

《圖3-4》 酵母菌ERG7 ^{G383X} 假設產物生成路徑推測圖.....	78
《圖3-5》 酵母菌ERG7 ^{T384G} 結構模擬圖，野生型ERG7結構 以綠色表示.....	80
《圖3-6》 A. 酵母菌ERG7 ^{T384S} 結構模擬圖，野生型ERG7結構 以綠色表示；B. 酵母菌ERG7 ^{T384C} 結構模擬圖，野生型 ERG7結構以綠色表示.....	81
《圖3-7》 A. 酵母菌ERG7 ^{T384N} 結構模擬圖，野生型ERG7結構 以綠色表示；B. 酵母菌ERG7 ^{T384D} 結構模擬圖，野生型 ERG7結構以綠色表示.....	82
《圖3-8》 A. 酵母菌ERG7 ^{T384F} 結構模擬圖，野生型ERG7結構 以綠色表示；B. 酵母菌ERG7 ^{T384Y} 結構模擬圖，野生型 ERG7結構以綠色表示.....	84
《圖3-9》 酵母菌ERG7 ^{T384X} 假設產物生成路徑推測圖.....	86
《圖3-10》 ERG7 ^{T384N} (藍色)、ERG7 ^{G383N} (紅色) 與野生型 ERG7 (綠色) 之比較模擬結構圖.....	88
《圖3-11》 合成之質體 DNA- YCCUGT73K1_pMK-RQ 電泳 檢驗圖.....	89
《圖3-12》 重組質體 DNA- pET28a (+) / UGT73K1 電泳 檢驗圖.....	90

《圖3-13》 pET28a (+) UGT73K1在大腸桿菌BL21 (DE3) 的表現及純化結果.....	91
《圖 3-14》 轉醣酵素 UGT73K1 之 MALDI-TOF MS 圖.....	92
《圖3-15》 利用 CID 對胜肽片段 (m/z 1490.789) 進行碎裂 所得到之 MS/MS 圖譜.....	92
《圖 3-16》 酵素耦合反應式.....	94
《圖3-17》 UGT73K1 酵素耦合活性測試反應結果.....	94
《圖3-18》 皂苷轉醣酵素 UGT73K1、GmSGT2、UGT74M1、 GmSGT3 與 UGT71G1 胺基酸序列比對結果.....	96
《圖 3-19》 轉醣酵素 GmSGT2 及 GmSGT3 的作用機制.....	98



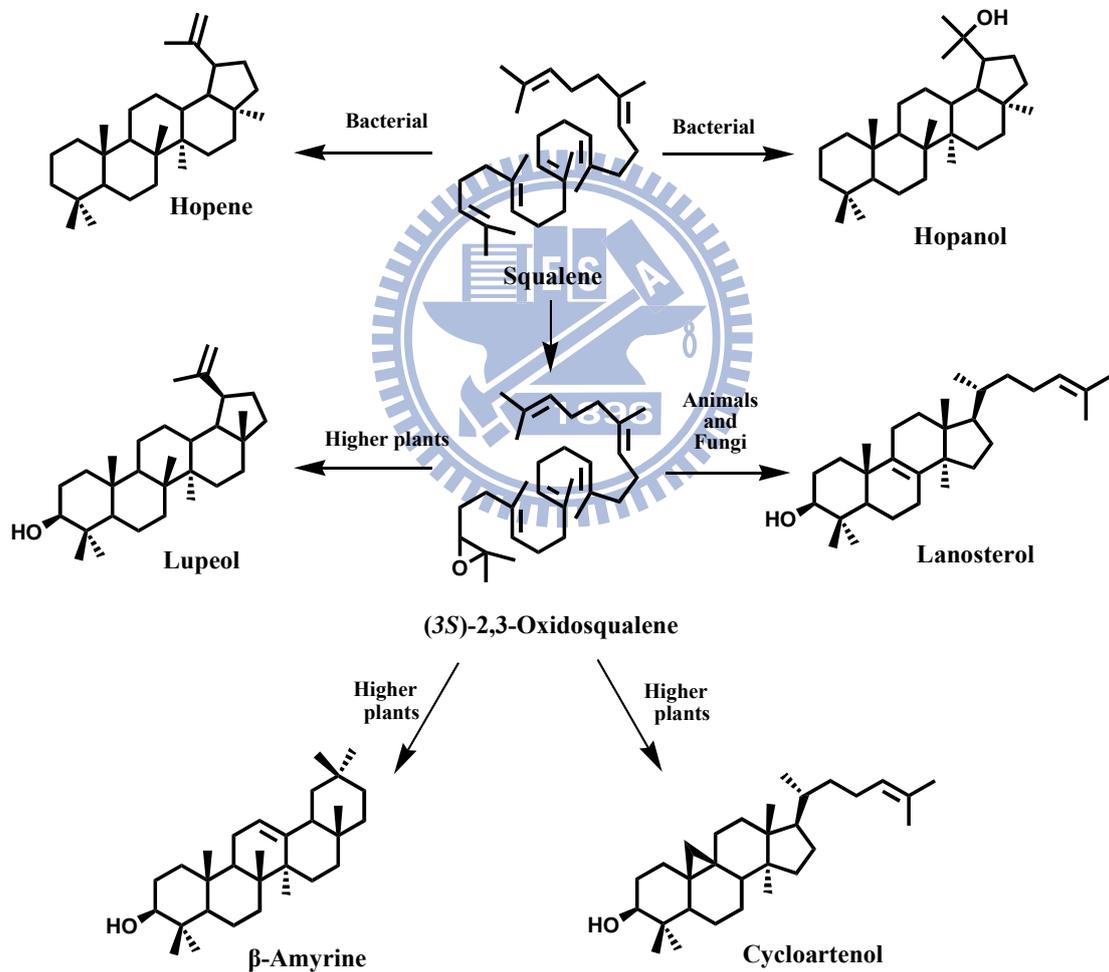
第一章 序論

1.1 氧化鯊烯環化酵素簡介

氧化鯊烯環化酵素屬於自然界三萜類環化酵素家族的一族，三萜類化合物 (triterpenoid) 是一群以五個碳的異戊二烯 (isoprene) 為其單元組成所衍生而來的多烯類產物。目前，已知由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¹。這些三萜類化合物主要是以直鏈狀的氧化鯊烯 ((3S)-2,3-oxidosqualene) 為受質，經由單一酵素的催化反應，並藉由酵素與受質間具有立體選擇性的環化及骨架重排作用，包括雙鍵或環氧鍵 (epoxide) 的質子化 (protonation)、誘導開環、環化 (cyclization)、甲基與氫化基之重組 (rearrangement)、與最後的中止脫除 (elimination) 反應，生成存在於自然界各物種中具有特異性的產物。不同物種間依其不同的環化酵素，能分別將氧化鯊烯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²。

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) 環化進而生成四環之環阿屯醇 (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、真菌與其他甲基營生菌 (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)。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 1-1》。

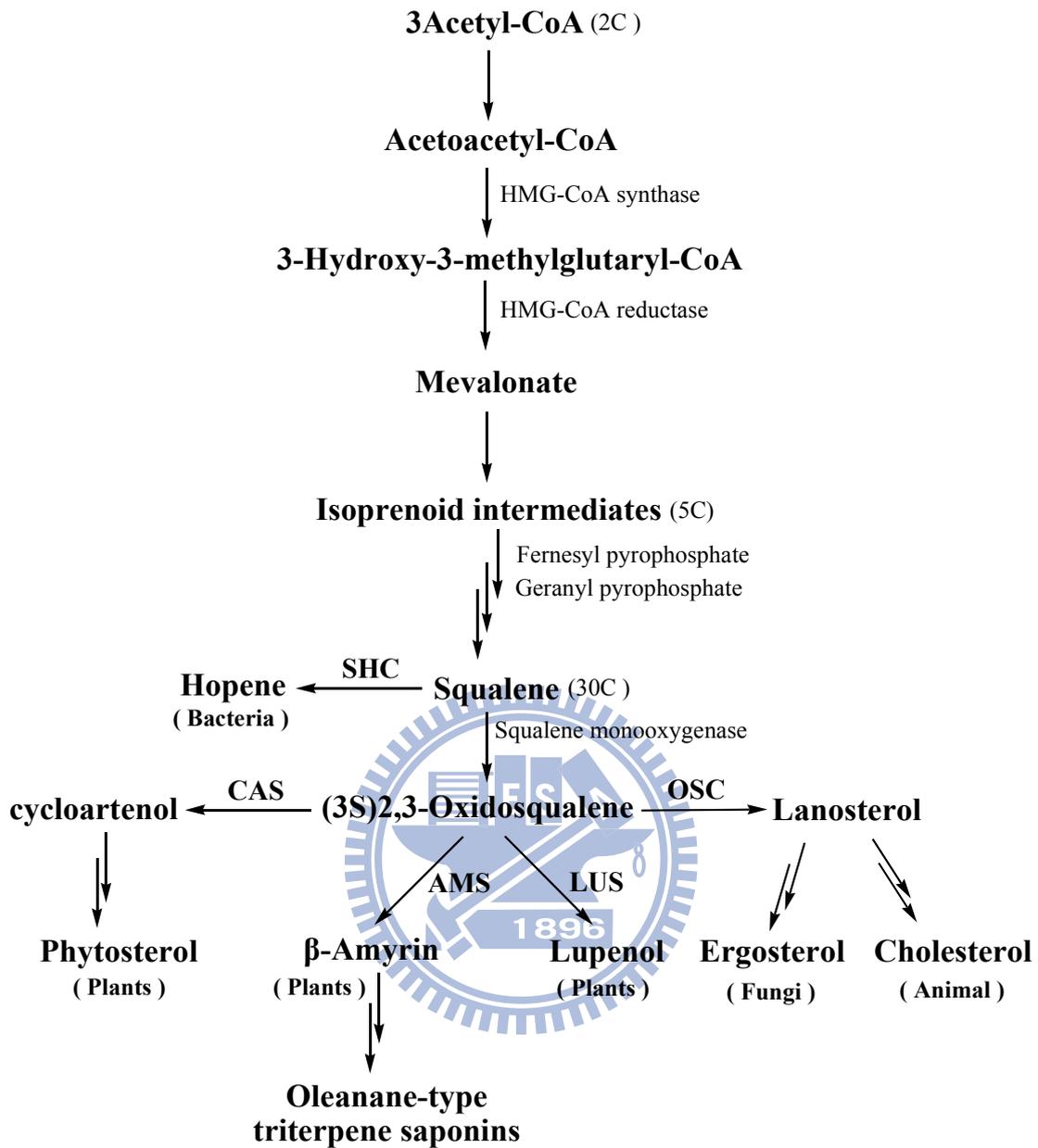


《圖 1-1》三萜類環化酵素在不同物種間的產物專一性和多樣性

固醇類 (sterol) 是多環脂醇類物質的通稱，其組成通常是以四

至六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³，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。

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）¹，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分別形成二萜基焦磷酸鹽（geranyl pyrophosphate）；三萜基焦磷酸鹽（farnesyl pyrophosphate）與最後產生的疏水性鯊烯（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《圖1-2》。



《圖1-2》固醇類生合成途徑

在動物體內，最常見的固醇類物質為膽固醇其是以一種類似脂肪的複合體存在於人體。膽固醇在動物體內參與了許多與新陳代謝相關的生理調控。其主要是由肝臟製造產生，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⁴。由於它是細胞膜脂質

筏 (Lipid raft) 的重要成分，脂質筏是指細胞膜中一塊固性區域，即一塊較不具流動性的富含膽固醇的區域，當細胞膜上膽固醇比例增加時，細胞膜的流動性會減少，因此可藉此調控細胞膜的流動性，進而影響胞內外物質的滲透⁵。許多文獻研究也指出，脂質筏可能與訊息傳遞、發炎反應、細胞移動 (Migration)、並與神經傳導等疾病的發生有關，如阿茲海默症 (Alzheimer's disease) 等⁶。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⁷。膽固醇也是膽汁、固醇類荷爾蒙、維生素D、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，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，以刺激基因表現與增加骨質的密度。另外，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。

目前最有效的降膽固醇藥物為HMG-CoA Reductase 抑制劑—Statins 及具相關類似物，包含Lovastatin, Pravastatin, Simvastatin,

Fluvastatin 等。此類藥物抑制的位置位於膽固醇生合成的上游，因此會進而影響其下游產物異戊二烯中間物與三萜類化合物的生成，導致具有重要功能之二次代謝物的生成與調節受到影響。而氧化鯊烯環化酵素位於整個反應的中下游，若由此處做為研發抑制物的研究標的，對身體的副作用理論上會相對較小，故近年來針對氧化鯊烯環化酵素抑制劑的合成，已成為研發降膽固醇和抗黴菌藥物的新目標⁸。

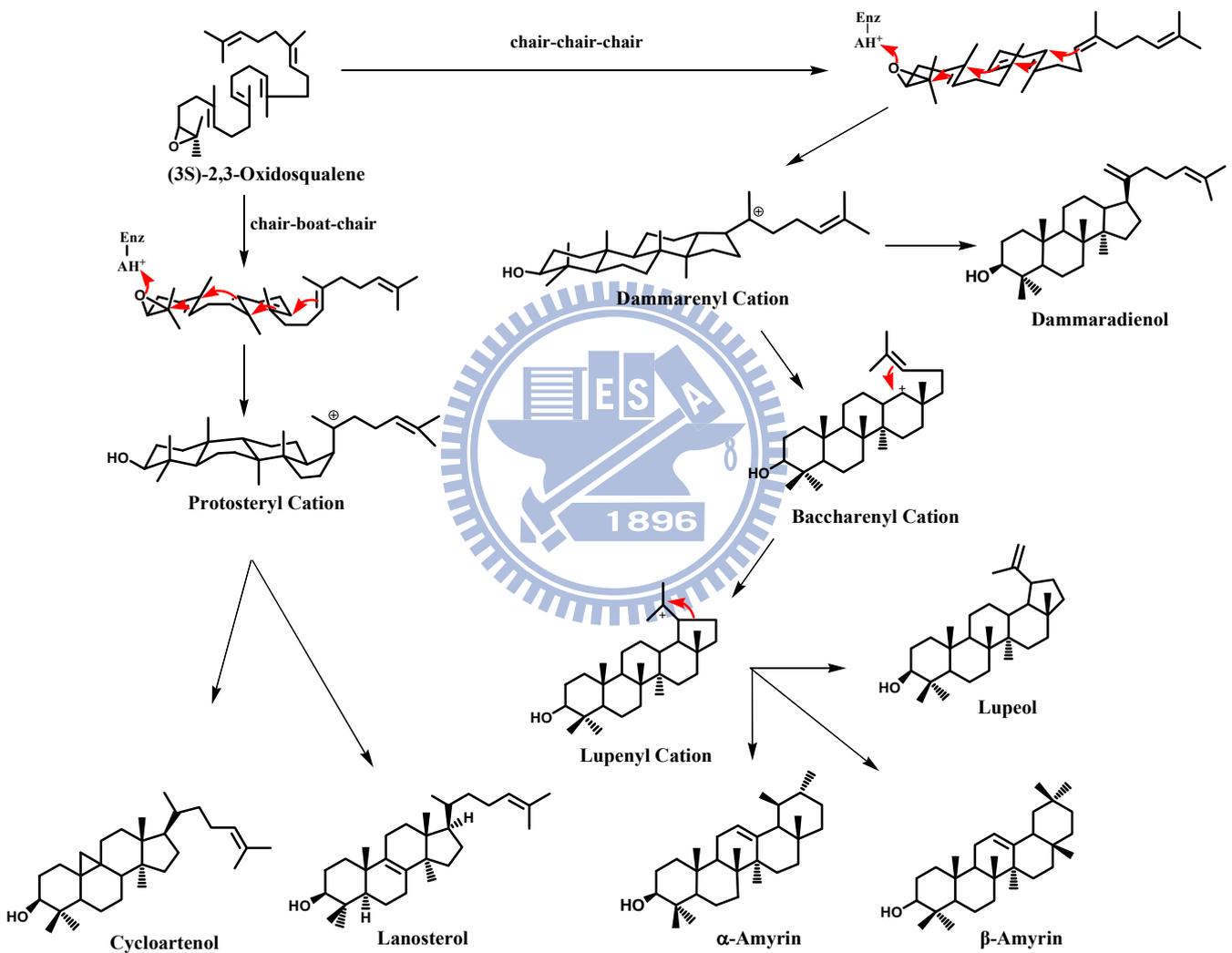
1.1.1 氧化鯊烯的結構與其環化機制

此具有反應複雜性、產物多樣性和重要生理功能，且僅需單一步驟的氧化鯊烯環化酵素催化反應，對於其催化氧化鯊烯進行環化反應，進而形成多環多烯類 (terpenes) 的催化機制在這半世紀以來一直是分子生物學家及化學家所公認是最迷人及最具挑戰性的生物轉化反應之一。

在先前的研究文獻中，Corey 與 Bloch 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⁹。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，而其非3(*R*)的鏡像異構物¹⁰。另外，突變實驗證明了胺基酸 Asp456 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。因此，此 Asp 被認為是誘導環氧基開環的重要基團。

目前已被報導出來約有近兩百多種氧化鯊烯環化酵素的產物，它們是經由類似的酵素催化機制因此都具有相似的骨架結構，但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。整體來說環化過程是由環化酵素中的酸性胺基酸提供電子，進而使得親核性的雙鍵或是環氧基藉由其親核性作用進行開環起始反應，其中包含了16個鍵的斷裂與生成，並經過一連串的碳陽離子-烯烴環化作用（cation-olefin cyclization）生成帶有正電的高能碳陽離子中間產物（cationic intermediates）。而大部分的碳陽離子中間產物皆只存在於十分短暫的時間，所以並不容易被科學家所分離。相同的反應受質氧化鯊烯在不同的氧化鯊烯環化酵素活性區域中具有兩種摺疊方式，期分別為椅形-船形-椅形（chair-boat-chair）與椅形-椅形-椅形（chair-chair-chair），因為摺疊方式不同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，會生成二種類型的碳陽離子中間物，（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），其再經過不同的甲基與氫化基之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）。（二）經由 chair-chair-chair 骨架摺疊形成之達瑪烯碳陽離子中間物（Dammarenyl

Cationintermediates) ，其在不同酵素中繼續誘導環化形成 6-6-6-6-5 及 6-6-6-6-6 之五環的碳陽離子中間物，接著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¹¹⁻¹³ 《圖1-3》。



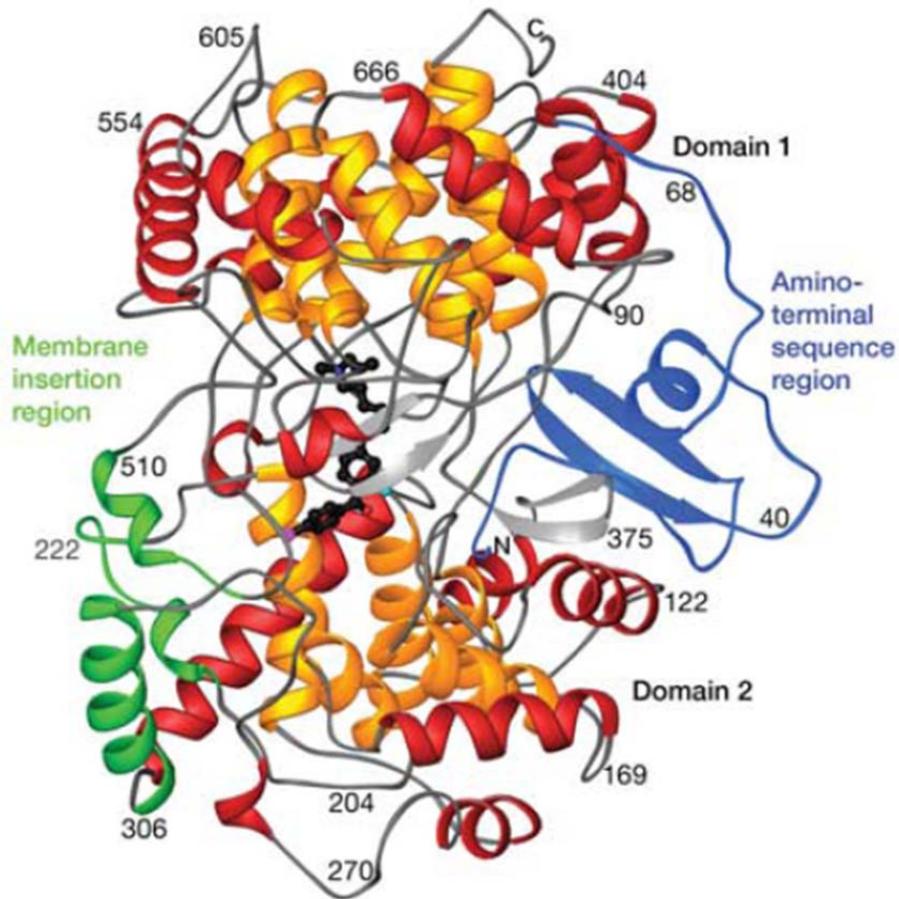
《圖1-3》 氧化鯊烯在酵素內的摺疊方式與其產物

1.2 氧化鯊烯環化酵素探討

氧化鯊烯在不同物種間會經由不同的折疊方式而形成四環或五環之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。而接下來將對氧化鯊烯環化酵素的酵素催化反應及環化機制作進一步的介紹。

1.2.1 人類氧化鯊烯-羊毛硬脂醇環化酵素

Thoma 等人在 2004 年將人類氧化鯊烯-羊毛硬脂醇環化酵素 (OSC) 之 X-ray 晶體結構解出，並發表於當年的 Nature 期刊中¹⁴。由於 OSC 結構的確定《圖 1-4》，除了對酵素活性區域及其胺基酸基團可能參與的反應機制有更深入的瞭解，也可以利用人類 OSC 的結晶結構作為模板，提供結構與環化機制等相關訊息，將對於不同物種的氧化鯊烯環化酵素能有更進一步的研究。



《圖1-4》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時的反應活性位置¹⁴

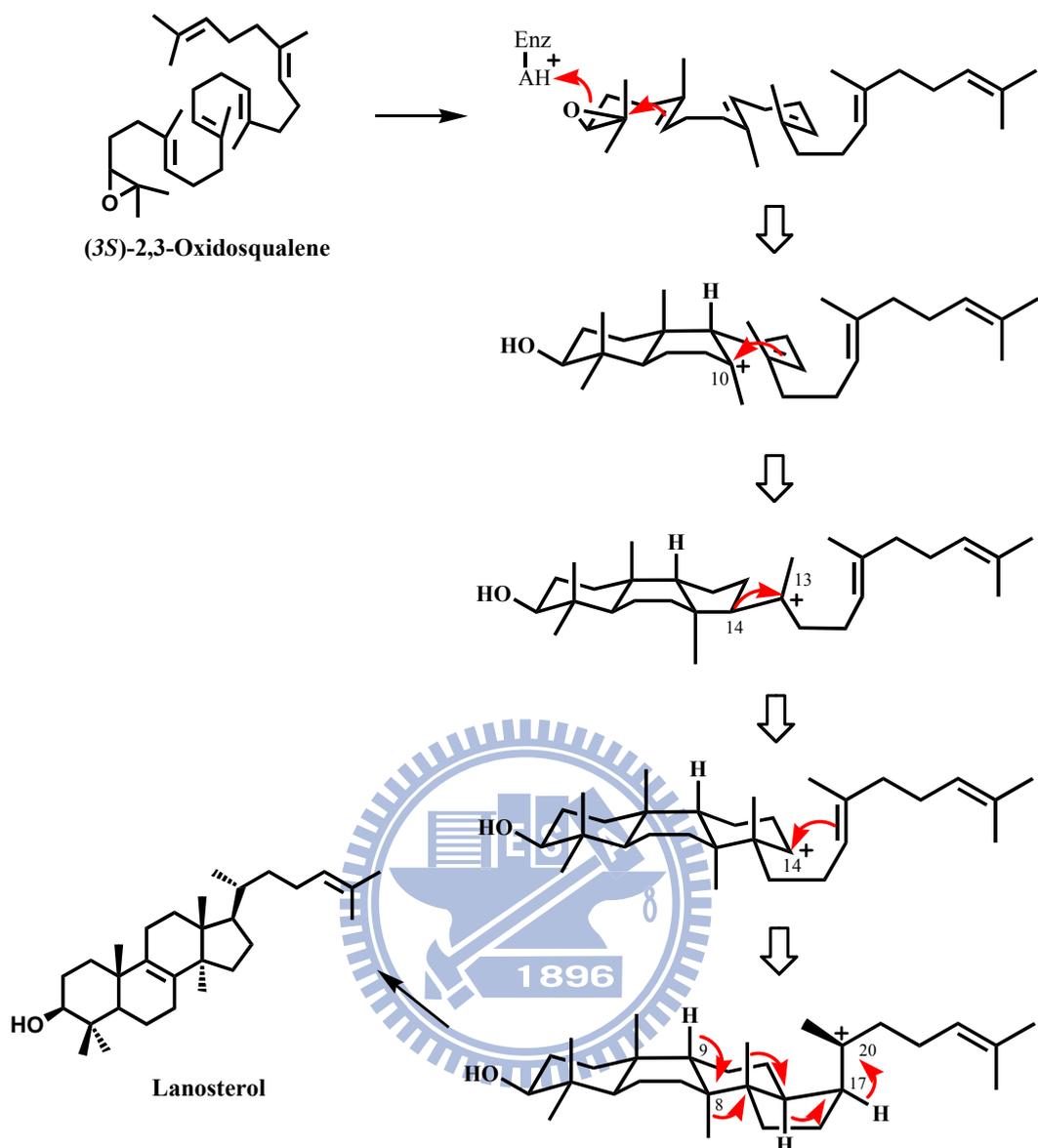
1.2.2 氧化鯊烯-羊毛硬脂醇環化酵素

氧化鯊烯-羊毛硬脂醇環化酵素主要存在於真菌類與動物中，催化受質氧化鯊烯進行環化反應以形成四環的羊毛硬脂醇。在酵母菌 (*Saccharomyce scerevisiae*) 中，*S.c.ERG7* 是由 *ERG7* 基因所轉譯出來的膜蛋白，由2,196個鹼基對轉譯所生成的731胺基酸序列，其理論分子量為83.7 kDa。此酵素具有與膜結合的特性，加上分子量很大，

因此在純化上其實十分不易，至今尚未有結晶結構被解析出來，所以目前對 ERG7結構與催化機制方面的探討，主要是透過分生技術及反應受質類似物等以下三種方式來進行：（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，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，本實驗也是利用突變實驗所得到的產物，藉此推測環化過程中胺基酸的催化功能。

1.2.3 氧化鯊烯-羊毛硬脂醇環化酵素反應機制

如前一節所述，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 Asp 會提供質子來誘導環氧基進行開環反應，引起電子的轉移環化而形成A至D環，並產生許多高能量的碳陽離子中間物，最後碳陽離子會落在C-20位置上形成原脂醇碳陽離子中間物(protosteryl cationic intermediate)，再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以進行脫氫反應而形成最終的產物羊毛硬脂醇《圖1-5》。

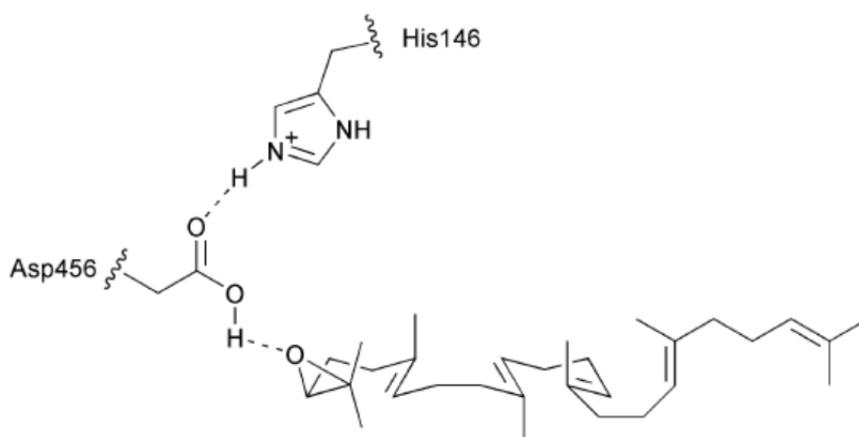


《圖1-5》氧化鯊烯-羊毛硬脂醇環化酵素之環化機制

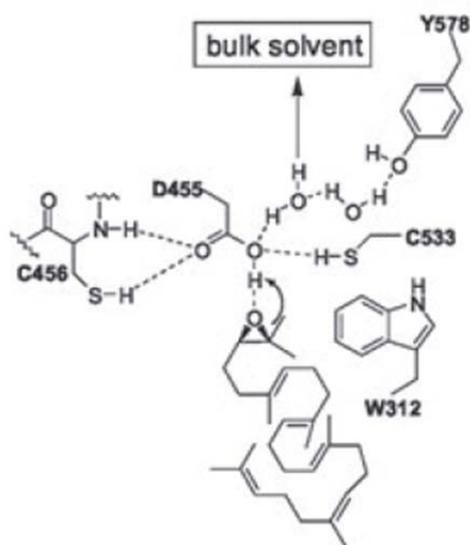
1.2.3.1 開環起始反應和 A 環的形成

在先前的研究中指出，若將鯊烯 (squalene) 置於中性或弱酸的溶液中，在室溫下可穩定地存放一天，因此強酸被認為是開環起始反應中所必需的。1997年，Corey 等人利用一系列丙胺酸定點突變式掃

瞄法 (alanine scanning site-directed mutagenesis) 針對酵母菌 ERG7 活性區域內高度保留性的胺基酸進行實驗，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^{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1-6》¹⁷。另外從人類 OSC的X-ray結晶結構也可以發現，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1-7》¹⁸。



《圖1-6》酵母菌ERG7假設開環環化機制¹⁷



《圖1-7》人類OSC開環環化機制¹⁸

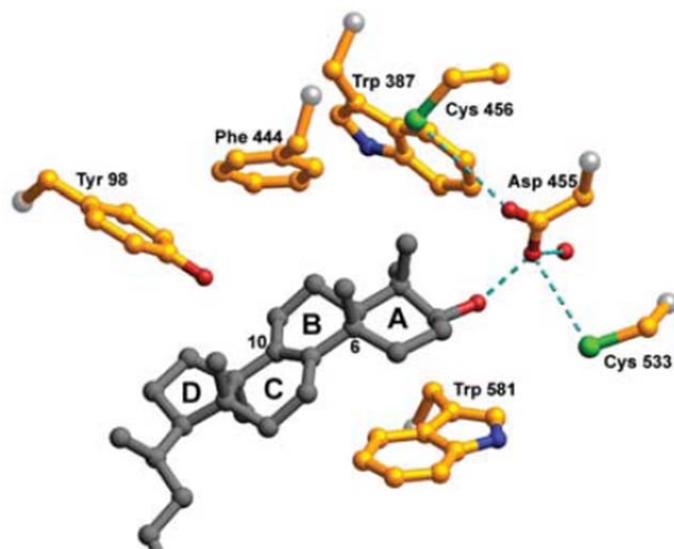
另外，在1997年 Corey 等人也利用酸性催化劑對5,6不飽和環氧乙烷（5,6-unsaturated oxiranes）和其衍生物進行一系列的反應¹⁹，此實驗證明環化反應的起始除了需要有酸性基團在適當的位置提供質子外，還需要受質在適當的摺疊方式下，使其環氧基上C-O鍵在斷裂的同時，伴隨著C-C雙鍵的斷裂，而使開環反應和A環的形成同時發生。近年來，理論計算的結果也都認同在經由質子化開環反應後，會同步引起A環的環化形成，因此這兩個步驟目前為止被認為是同步發生的²⁰⁻²²。

1.2.3.2 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環的形成發現在酵母菌 ERG7內的胺基酸 Val454位置具有高度的保留性。將其對

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環形成²³。

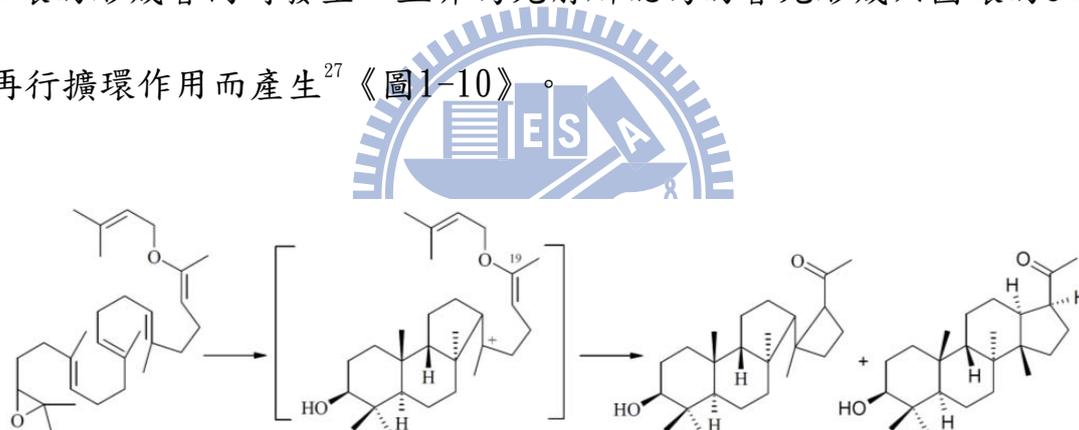
在2004年 Nature 所發表的人類 OSC結晶結構中, 關於B環形成時能量較不傾向的船形結構方面, Thoma認為 Tyr98其立體空間較大的側鏈推動氧化鯊烯C-10上的甲基到分子平面之下, 而進一步地阻礙B環形成能量較傾向的椅形構形《圖1-8》¹⁴。不過在對於酵母菌 ERG7胺基酸 Tyr99位置進行飽和定點突變實驗的結果顯示, Tyr99被證實是穩定C-14碳陽離子的角色, 在此位置進行突變則會得到(13 α H)-isomalabarica-14E,17E,21-trien-3 β -ol, (13 α H)-isomalabarica-14Z,17E, 21-trien-3 β -ol與羊毛硬脂醇等相關產物²⁴。而 Thoma等人也指出幾個具有高度保留性的胺基酸位置, 其中 Trp387, Phe444與 Trp581會利用其含有苯環的側鏈, 並透過碳陽離子- π 電子共振交互作用, 來穩定形成A環與B環時產生的C-6和C-10碳陽離子中間產物。



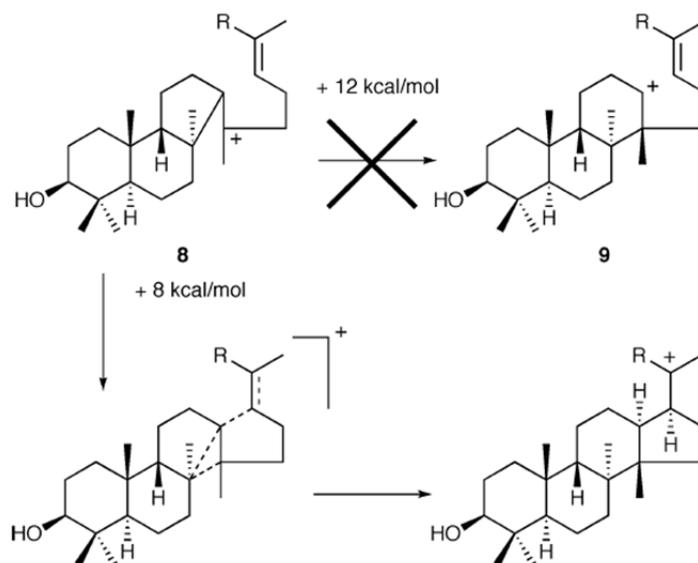
《圖1-8》 Trp387、Phe444與Trp581能穩定A環與B環形成時C-6、C-10碳陽離子中間物；Tyr98的側鏈藉由立體空間障礙促使B環形成能量較不傾向的船形結構¹⁴

在酵母菌 ERG7 Trp390位置的飽和定點突變實驗結果中，發現了單環產物 Achilleol A以及 Camelliol C，這也說明了在人類 OSC 中 Trp387可能扮演穩定在A環形成時的C-6碳陽離子中間物。而在酵母菌 ERG7 Trp587位置的飽和定點突變實驗結果卻有所不同，對產物進行分析後，十九種突變胺基酸除了同樣都是芳香族的胺基酸，其餘胺基酸皆沒有產物產生，這證明了 Trp587是利用芳香族胺基酸上的 π 電子雲來進行受質的辨認⁶²。最後，在酵母菌 ERG7 Phe445的定點突變實驗中，得到了三環與在三個不同位置去質子化的四環產物，由此證明在酵母菌 ERG7中，Phe445會影響形成C環時的C-14碳陽離子中間物與最後在C-8/C-9的去質子化步驟²⁵。

1995年，Corey等人在以 20-oxaoxidosqualene 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，藉由此結果他們推測，在C環形成的過程中會先形成五圓環，再經由擴環反應成為六圓環《圖1-9》^{18,26}。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²²；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²⁷《圖1-10》。



《圖1-9》利用類似物作為受質結果顯示C環會先形成五圓環²⁷

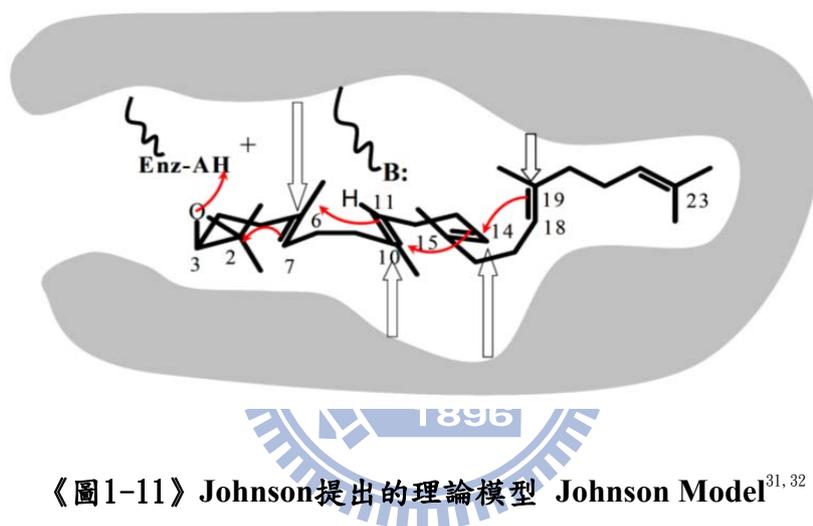


《圖1-10》Hess認為C環與D環會經由過度態 10 同時形成²⁷

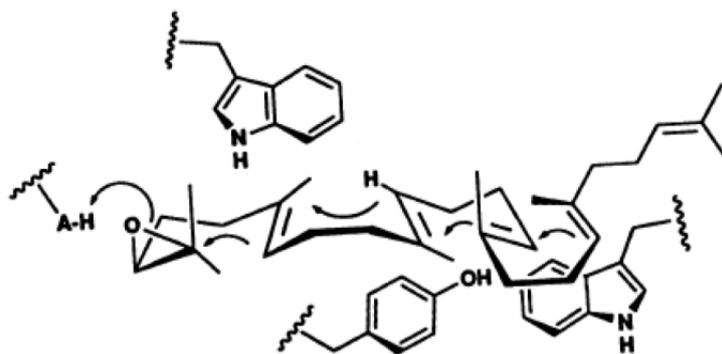
在人類 OSC的結晶結構中，His232與 Phe696被認為可以藉由其胺基酸側鏈上富含 π 電子的特性，來穩定形成C環時依著反-馬可尼可夫（anti-Markovnikov）法則所產生的二級碳陽離子，並且可以利用 π 電子與碳陽離子的共振作用來穩定帶有正電荷之高能C-20碳陽離子中間物，最後一連串的氧化鯊烯環化步驟會終止在由五圓環D環所形成的C-20原脂醇碳陽離子。然而從酵母菌 ERG7 His234位置的飽和定點突變實驗中，分離出(13R*H*)-isomalabarica-14(26),17*E*,21-trien-3 β -ol 三環產物，表示His234也參與C-14碳陽離子穩定的角色²⁸；在 Phe699位置的飽和定點突變實驗中，除了三環的相關產物以外，還發現了protosta-13(17)-dien-3 β -ol 和 (17*Z*)-protosta-17(20),24-dien-3 β -ol，這

結果則顯示 Phe699也對於C-17碳陽離子有所影響^{29, 30}。

目前，有兩種假說被提出來說明酵素是如何穩定這些在環化過程中具有高能量的碳陽離子中間物。1987年，Johnson提出了第一個理論模型（Johnson Model）《圖1-11》，他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）的正電高能量碳陽離子^{31, 32}。



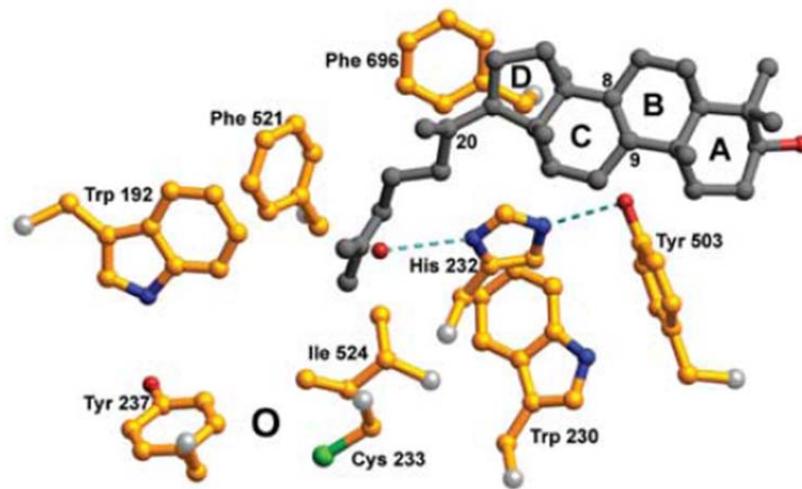
而在1992年 Griffin提出了另一個 Aromatic Hypothesis 的理論模組³³《圖1-12》。由於在氧化鯊烯環化酵素中，具有芳香族基團的胺基酸 Tyr, Trp 與 Phe 在各物種中皆具有高度保留性，因此 Griffin認為這些基團會利用碳陽離子- π 電子作用（cation- π interaction）的穩定效應，來引導受質進行適當的骨架摺疊並穩定具有高能量且帶正電的中間產物，使後續的甲基與氫化基可以做適當的轉移重排。



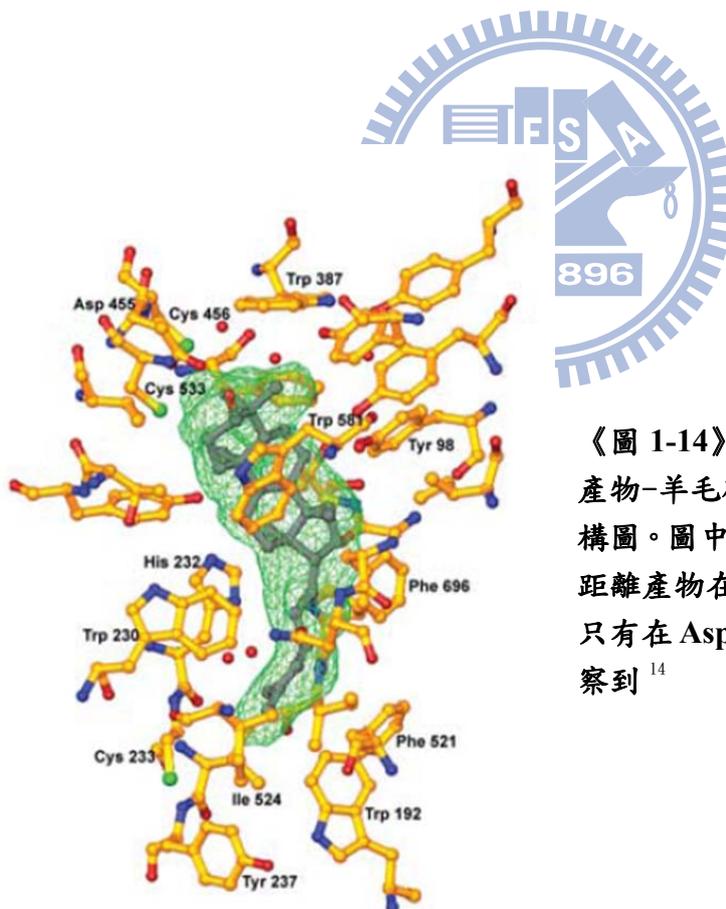
《圖1-12》Griffin所提出的Aromatic Hypothesis理論模組³³

1.2.3.3 骨架重排與脫氫反應

環化反應結束後，藉由酵素活性區域內許多具有高度 π 電子性質的芳香族胺基酸（如 Trp192, Trp230, His232, Tyr237, Tyr503, Phe521 與 Phe696 等），透過碳陽離子- π 電子的共振作用來穩定甲基與氫化基的轉移重排，使得C-20原脂醇碳陽離子得以順利轉移重排成C-8/C-9碳陽離子中間物《圖1-13》^{7,14}。而在人類 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，並進行整個環化機制最後步驟—脫氫反應的關鍵胺基酸位置。另外，His232除了會透過鄰近水分子之交互作用去影響催化反應的進行外，還會與其附近的 Tyr503側鏈上的氫氧基團產生氫鍵互相拉扯作用，使得 His232得以定位於脫氫反應的最佳位置《圖1-14》¹⁴。



《圖1-13》具有高度保留性的芳香族胺基酸可以利用碳陽離子與 π 電子共振交互作用去穩定甲基與氫化基的骨架轉移重排¹⁴



《圖 1-14》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 5\AA 內的位置，水分子只有在 Asp456 及 His232 附近被觀察到¹⁴

在酵母菌 ERG7 His234與 Tyr510的飽和定點突變實驗結果也更進一步證明這兩個胺基酸在活性區域內所具有的功能。在酵母菌 ERG7中 His234的定點突變產生了許多在不同地方進行脫氫反應的四環產物如 protosta-20,24-dien-3 β -ol, protosta-12,24-diene-3 β -ol 和 parkeol^{34,28}；在 Tyr510突變成 Ala的突變點中也發現了 parkeol^{35,36}。綜合以上結果，更加證明了 His234在酵母菌 ERG7活性區域中的功能，除了利用碳陽離子- π 電子的共振作用穩定甲基與氫化基的骨架重排以外，也會幫助酵素在正確的位置上進行脫氫反應³⁷。



1.2.4 氧化鯊烯-環阿屯醇環化酵素

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，兩者都是利用氧化鯊烯作為受質，且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，並經由相同的甲基與氫化基轉移機制，只是進行到最後一步去質子化步驟時，氧化鯊烯-環阿屯醇環化酵素會催化脫除C-9上的氫而生成環阿屯醇，而氧化鯊烯-羊毛硬脂醇環化酵素則催化C-8上的氫行脫除反應而生成羊毛硬脂醇。

從熱力學的觀點來看，環阿屯醇比羊毛硬脂醇較為不穩定，所以學者認為環阿屯醇環化酵素之所以可以將產物環化成能量較不趨向的環阿屯醇，可能是因為酵素 CAS 中某些特定胺基酸的作用，另外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是可能造成兩者脫氫位置不同的關鍵胺基酸。在先前對阿拉伯芥環阿屯醇環化酵素 (*AthCAS1*) 的突變實驗中也發現，Tyr410, His477 與 Ile481 在 CAS 環化機制中扮演著十分重要的角色且這些胺基酸在各物種的 CAS 皆是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³⁸⁻⁴¹ 《圖 1-15》。

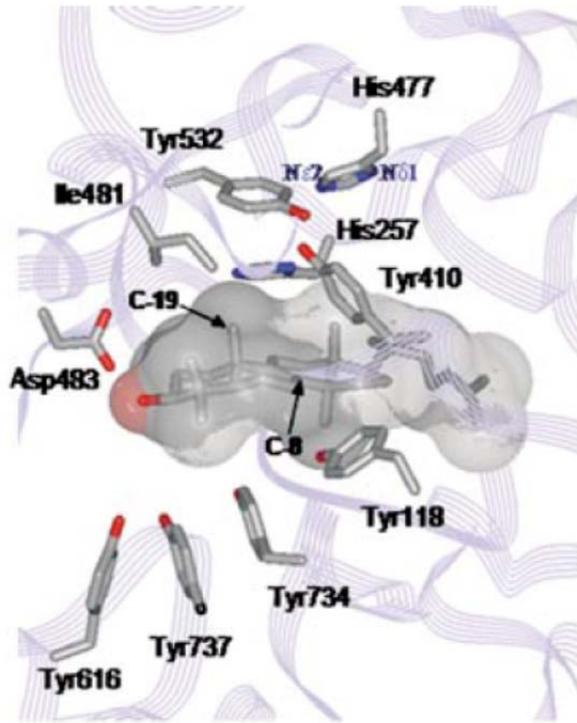


《圖1-15》 Tyr410 (◆)、His477 (*) 與Ile481 (▼) 在CAS1高度保留，而在ERG7中則被Thr、Cys、Gln及Val所取代³⁹。

根據研究結果顯示，Ile481會藉由其 γ 位置的甲基來防止碳陽離子與A環上兩支甲基的交互作用，來促使環阿屯醇的形成，而 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；CAS

His477雖不位於受質鍵結的活性區域，但是曾有報導指出，位於活性區外圍（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；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³⁹《圖1-16》。

另外在雙重定點突變株 *AthCAS1*^{I481V/Y410T} 中，發現其產生羊毛硬酯醇的比例比其他定點突變株高出許多；然而在三定點突變（His477Asn/Gln, Ile481Val, Tyr410Thr）中，因為 Thr的氫氧基距離 Asn與 Gln的氨基過遠，所以並沒有辦法促進羊毛硬酯醇的生成。而經實驗的結果證實，產生羊毛硬脂醇效率最好的突變株為雙定點突變株 *AthCAS1*^{H477N/I481V}⁴⁰《表1-1》。



《圖 1-16》氧化鯊烯-環阿屯醇環化酵素中 Tyr410、His477 與 Ile481 的相對位置³⁹。

《表1-1》阿拉伯芥中CAS定點突變產物及其比例分配表⁴⁰。

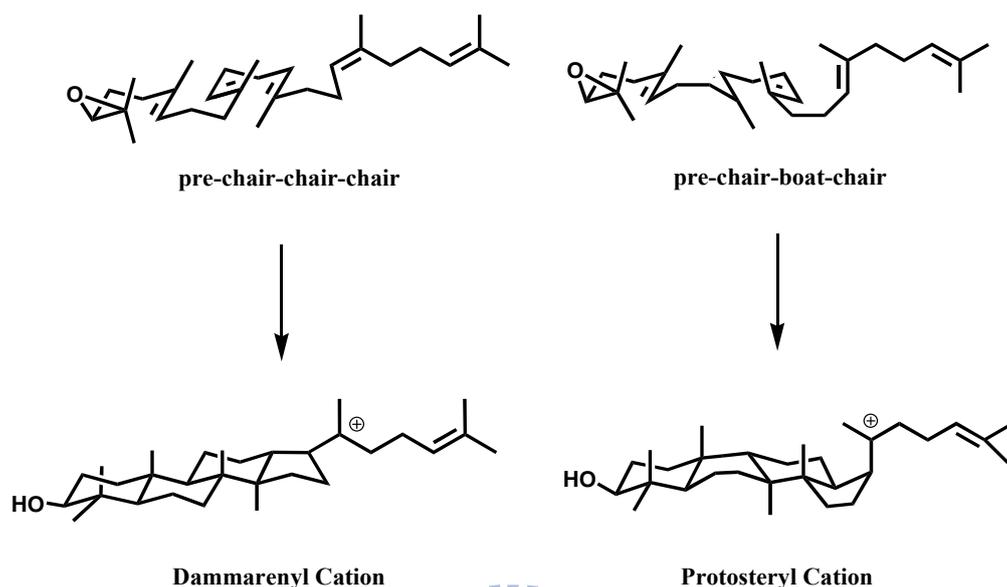
<i>Ath</i> CAS1 mutants	Cycloartenol	Lanosterol	Parkeol	9 β - Δ 7-Lanosterol	Achilleol A	Camelliol C
CAS1 ^{I481}	99	-	1	-	-	-
CAS1 ^{I481L}	83	1	16	-	-	-
CAS1 ^{I481V}	55	24	21	-	-	-
CAS1 ^{I481A}	12	54	15	-	13	6
CAS1 ^{I481G}	17	23	4	-	44	12
CAS1 ^{Y410T}	-	65	2	33	-	-
CAS1 ^{Y410C}	-	75	-	24	1	-
CAS1 ^{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	-	-	-

由上述及表1-1 可以看出在CAS的定點突變中，*AthCAS1H477N*，*AthCAS1I481V* 與兩者的雙定點突變株可以導致植物 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*可以在植物本身合成羊毛硬脂醇，最後命名為 LAS (lanosterol synthesis)。有趣的是從序列比對可以發現 LAS在 CAS胺基酸 His477與 Ile481位置分別被換成 Asn與 Val，這和在 CAS中突變的結果不謀而合，也顯示這兩個胺基酸對於羊毛硬脂醇合成的重要性。

1.2.5 氧化鯊烯-香桂素與氧化鯊烯-羽扇醇合成酵素

天然物中包含了數千種三萜類的產物，而這些產物大部分來自於氧化鯊烯環化酵素這個家族，在高等植物中除了環阿屯醇環化酵素 (CAS)，氧化鯊烯-香桂素合成酵素 (β -amyrin synthase, AMS) 和氧化鯊烯-羽扇醇合成酵素 (lupeol synthase, LUS) 同樣都是利用氧化鯊烯做為受質形成三萜類化合物。環阿屯醇環化酵素或氧化鯊烯羊毛硬脂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以及香桂素合成酵素則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《圖1-17》。



《圖1-17》酵素催化氧化鯊烯形成達瑪烯碳陽離子及原脂醇碳陽離子中間物

羽扇醇合成酵素以及香桂素合成酵素，它們彼此之間的基因序列比對相似度高達 80%，在比對組成這兩個雙子葉植物酵素其基因的七百多個胺基酸差異性發現，彼此間只有 80 個胺基酸相異，因為雙子葉這種高等植物起始於近代，演化時間自然沒有很長，所以他們序列上的相似度高十分高；但是，由於其序列比對相似度高且其中間產物達瑪烯碳陽離子也相同，卻產生兩種最終產物，這使得研究策略上必須專注於彼此之間不同的胺基酸殘基而不是那些具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，並探討其功能。

根據這種想法 Ebizuka 團隊對於羽扇醇合成酵素和香桂素合成酵

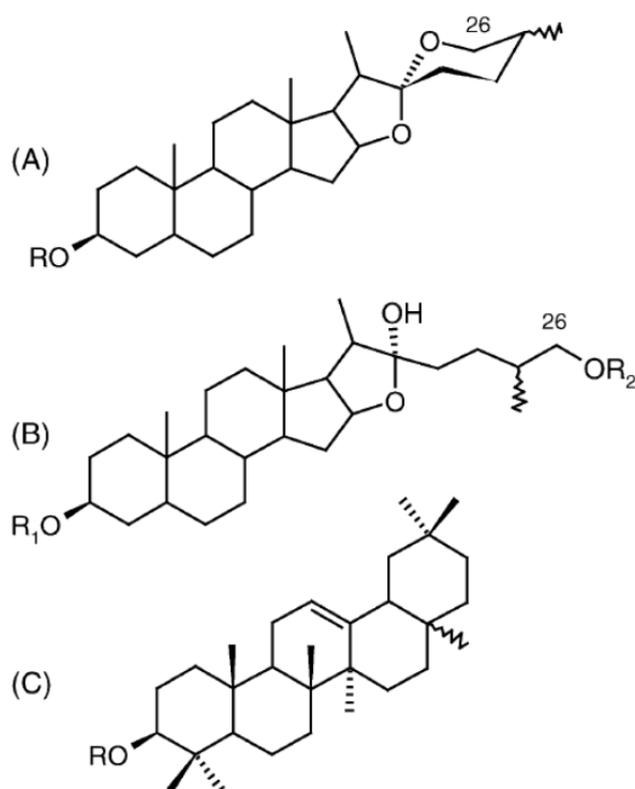
素彼此間這 80 個不同的胺基酸進行定點突變的研究，先進行酵素構形的模擬，找出可能為活性區域的胺基酸，接下來使用定點突變的方式觀察其產物的差異；發現了 LUS 中的 Leu256 對應於 AMS 中的 Trp259 為這兩個酵素產物特異性的調控胺基酸⁴²。因此研究人員將原本產生羽扇醇 LUS 中的 Leu256 突變成 AMS 相對應的 Trp 結果產生了高達 75% 的 β -香桂素，而將原本產生 β -香桂素 AMS 中的 Trp259 突變成相對應的 Leu，所產生的羽扇醇為 β -香桂素的兩倍之多，藉此確定這個位置的胺基酸為羽扇醇合成酵素和 β -香桂素合成酵素的產物特異性調控胺基酸。



1.3 皂苷簡介

皂苷 (saponins) 是廣泛分布於高等植物中很重要的二級代謝產物，具有很好的表面活性，於空氣混和後能形成水溶液或膠固體水溶液並能形成泡沫狀。皂苷由皂苷配基 (sapogenin) 與糖基 (glycone) 組成，常見的糖有 D-葡萄糖 (glucose)、L-鼠李糖 (Rhamnose)、D-半乳糖 (galactose)、L-阿拉伯糖 (Arabinose)、L-木糖 (xylose)；常見的糖醛酸有葡萄糖醛酸 (Glucuronic acid)、半乳糖醛酸 (galacturonic acid)，一個或多個糖基會與皂苷配基分子中的 C3-OH 相縮合，或是與皂苷配基分子中的 C3-OH 加上其他不同位置上的 OH 相縮合，皂

苷配基分子中的 COOH 也可能與醣基連接，形成酯苷鍵。根據已知的皂苷分子結構，主要可區分為兩大類，一類為固醇皂苷 (steroidal saponins)，固醇皂苷配基大部分是由 27 個碳的碳鏈骨架組成，通常為六環結構，有些在 C26-OH 的位置接有醣基而為五環結構。另一類為三萜皂苷 (triterpenoid saponins)，三萜皂苷配基一般是由 30 個碳的碳鏈骨架組成，通常為五環結構⁴³《圖 1-18》。



《圖 1-18》皂苷配基的典型骨架結構，(A)、(B) 為固醇皂苷，(C) 為三萜皂苷，R 為醣基⁴³

由於二級代謝產物並不直接參與植物的生長及發育，這些產物的累積通常是受到其對應於外在環境改變的刺激所引起，最重要的例子

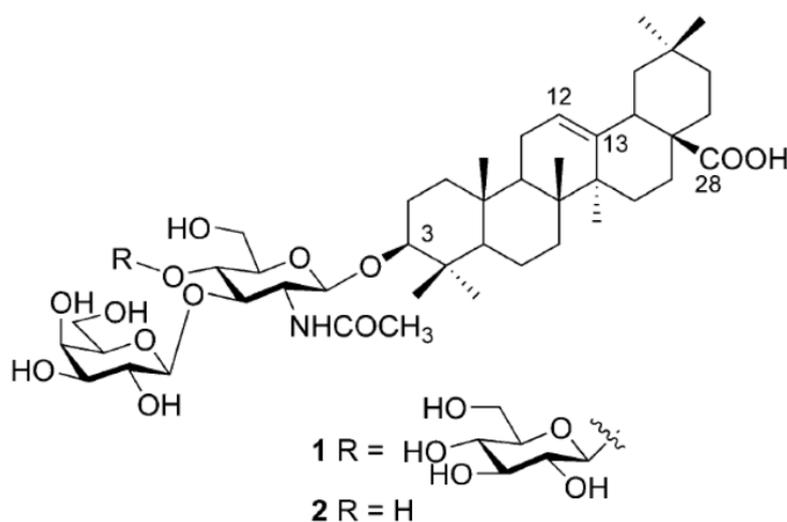
是為了保護自身來自食草動物及病原體的攻擊，以及在不適合的生存環境下能夠繼續維持生命⁴⁴。正因為如此，皂苷在高等植物所生成之產物具有豐富的多樣性，目前對於其生合成中相關的酵素和機制還有許多未知的地方，而 Haralampidis 等人認為在皂苷生合成途徑中最關鍵的兩個步驟，一個為氧化鯊烯的環化作用，另一個為皂苷配基的醣基化作用⁴⁵。

1.3.1 皂苷的生物活性

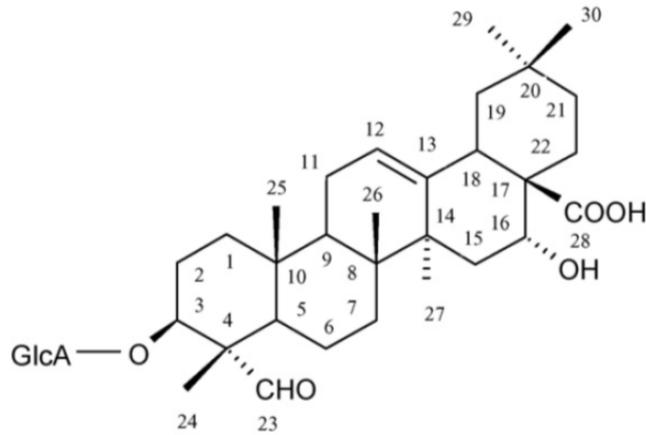
皂苷由極性（醣基）與非極性（皂苷配基）兩部分組成，因此具有很強的表面活性。其一般通性為，加水共搖混合形成膠體溶液可產生持續性的泡沫，味道苦澀、辛辣，以及有強烈溶血活性。

皂苷擁有使紅血球破裂的能力，目前已有許多研究指出，此生物效應是因為皂苷會與紅血球細胞膜內的固醇類物質進行交互作用，而使細胞膜破裂並促進其滲透性提高而導致血紅素游離⁴³。Oda 等人對 47 種不同之植物皂苷作溶血活性的探討，他們認為溶血程度與皂苷配基的形態和醣基接上皂苷配基的型式有關，除此之外，具有醣基或環氧基的皂苷似乎都較有溶血活性⁴⁶。另外也有文獻報導，三萜皂苷一般有顯著的溶血活性，但在 C-3 及 C-22 或 C-26 都有醣基的三萜皂苷和固醇皂苷則較不顯著⁴⁷。

皂苷對於冷血動物有很高的毒性，但對於恆溫動物其口服的毒性則相當低，因其在動物體內幾乎不被吸收，但會影響小腸黏膜細胞的通透性，而抑制營養性物質、藥物和毒物的吸收。皂苷也被發現可降低血清中的膽固醇，其亦可抑制消化酵素，像是胰蛋白酶(trypsin)和凝乳蛋白(chymotrypsin)，也可藉由與蛋白質形成複合物而防止酵素降解⁴⁸⁻⁵⁰。許多皂苷對黴菌有抑制活性的能力，對其他微生物也有微弱的毒性，例如紫苜蓿皂苷就對 *Rhizoctonia solani* 和 *Aspergillus niger* 等具有抑制效果⁵¹。而近年來也有許多文獻提出，皂苷對於細胞毒殺能力和抗癌方面的研究，似乎也有不容小覷的潛力發展，像是 lotoidoside D 和 lotoidoside E⁵² 《圖 1-19》以及 3-O-β-D-glucuronopyranosyl-quillaic acid⁵³ 《圖 1-20》。



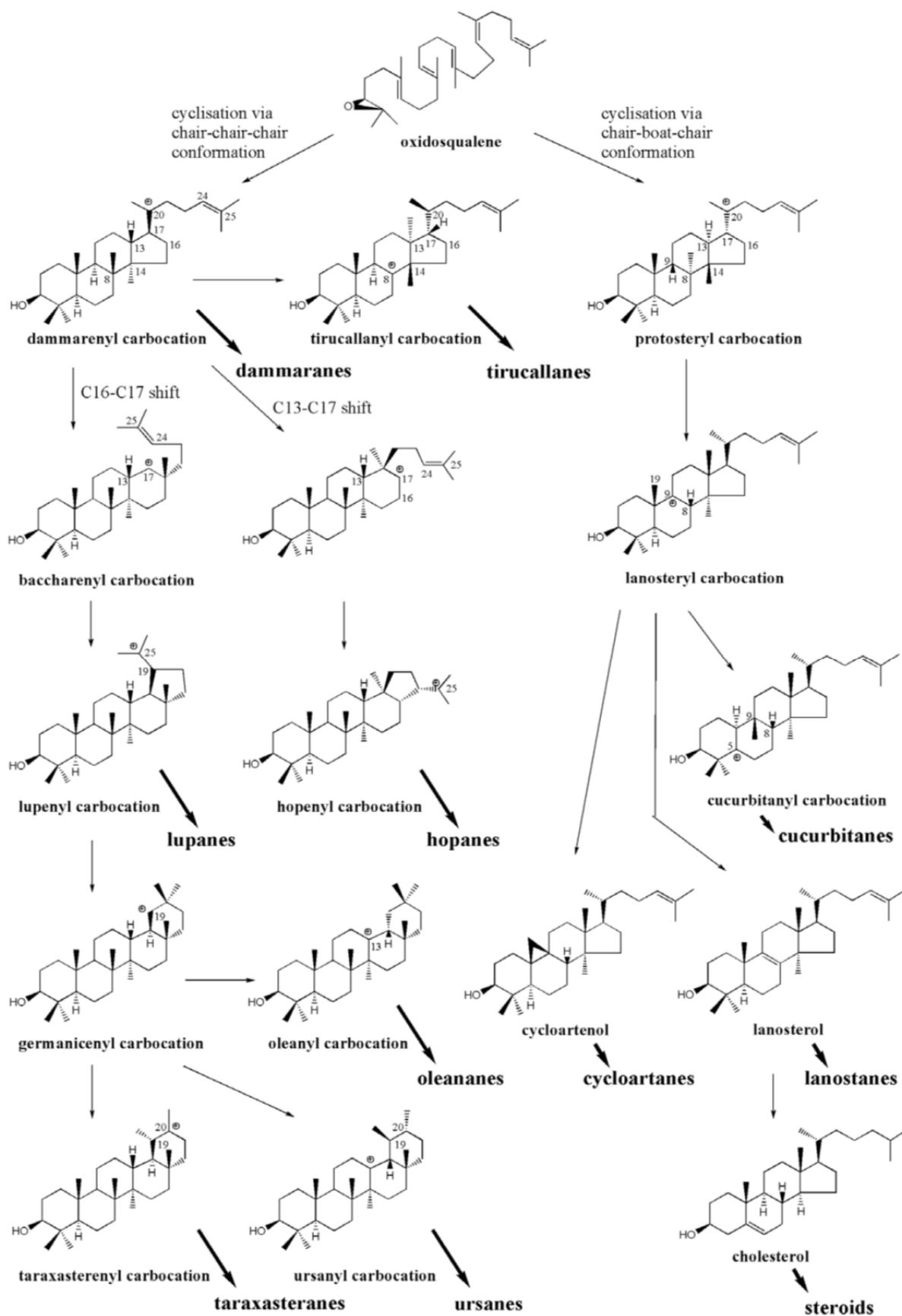
《圖 1-19》 lotoidoside D (1) 和 lotoidoside E (2) 在低濃度下對於 HeLa cell 也有很好的抑制活性⁵²



《圖 1-20》3-O- β -D-glucuronopyranosyl-quillaic acid 對於治療 HIV、瘧疾和腫瘤之疫苗具有作為佐劑的潛力⁵³

1.3.2 皂苷生成探討

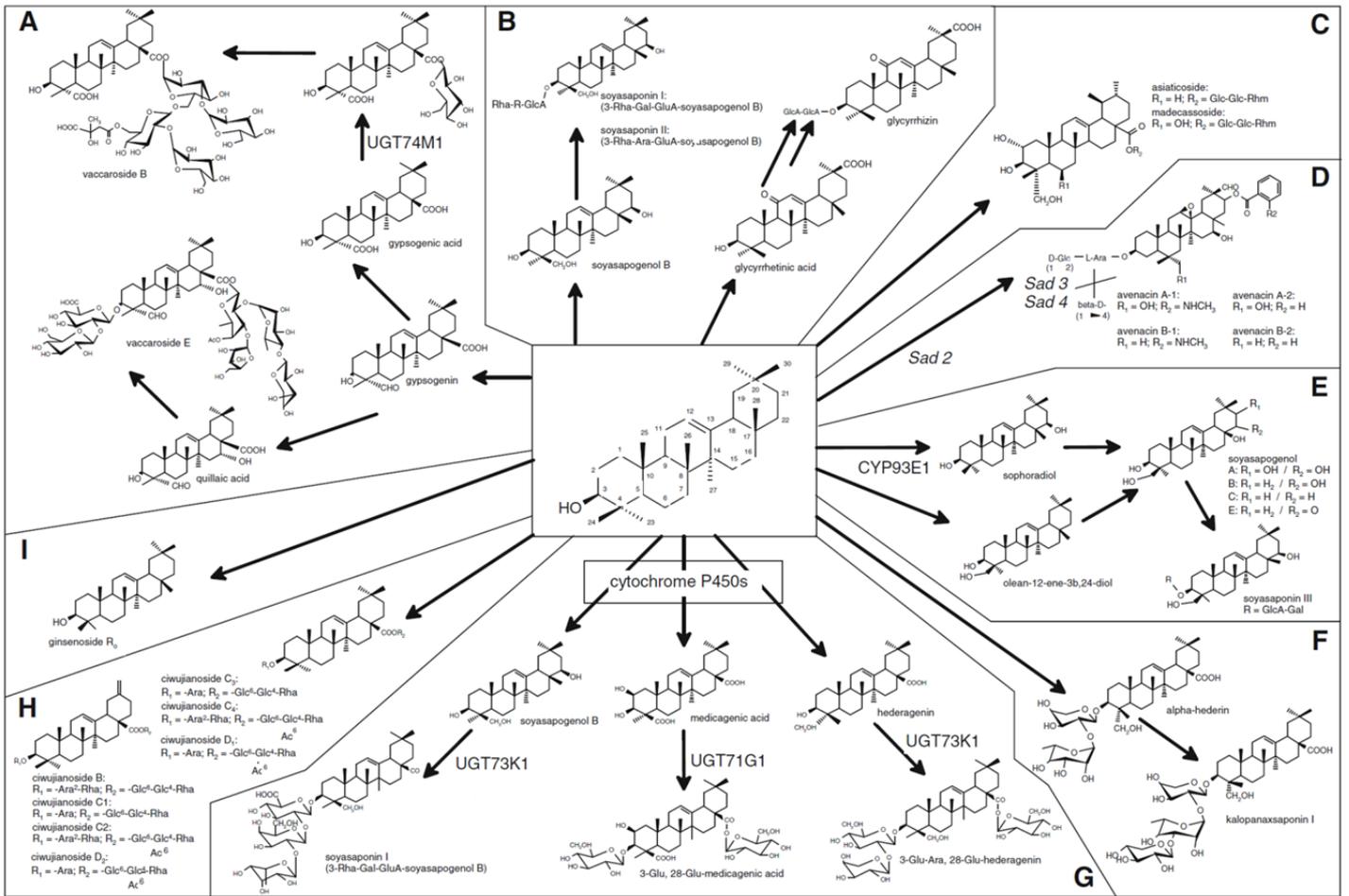
皂苷顧名思義就是由皂苷配基和糖基所組成，關於三萜類化合物和固醇類生合成途徑在前一章節已有充分的介紹，氧化鯊烯藉由環化酵素進行環化反應而形成各物種間多樣的產物型態。Vincken 等人歸納整理了許多歷年來關於皂苷已發表的文獻，將皂苷配基大致區分為 11 類，此分類涵蓋了幾乎所有植物物種的皂苷⁵⁴《圖 1-21》。雖然目前對於三萜類化合物骨架之後如何形成皂苷的生合成機制還未有完整的瞭解，但由於生物資訊的發展，學者利用表現序列標幟 (Expressed Sequence Tags, ESTs)，對選殖出來的植株自動定序後，他們認為三萜類化合物骨架除了原有的 C3-OH，其餘修飾皆為藉由細胞色素 P450 氧化酶 (cytochrome P450 oxygenase) 以進行羥化反應；並藉由轉糖酵素 (glycosyltransferases) 進行其糖基化反應^{55,56}。



《圖 1-21》11 種主要皂苷配基骨架⁵⁴

皂苷的結構擁有如此多樣性的變化，除了環化作用帶來皂苷配基骨架上的不同，糖基化作用更是造成差異的主要因素。轉糖酵素將帶有尿嘧啶核苷二磷酸（uridine 5'-diphosphate, UDP）的糖基轉移至皂苷配基的氫氧基上，而這些氫氧基上的單糖、雙糖或著是糖鏈，是由不同的轉糖酵素將糖基一個一個接上去，而不是預先形成糖鏈後才經由酵素作用到皂苷配基上⁵⁷。大部分的皂苷都有一項共同的特徵，其C3-OH 上都會接有糖基或糖鏈，且此項特徵被認為是皂苷具有生物活性的關鍵⁴⁵。目前已知的轉糖酵素並不多，且已發表的文獻報導中大多是由高等植物中之 β -香桂素衍伸而來的皂苷產物⁴⁴《圖 1-22》。





《圖 1-22》由 β-香桂素衍伸而來的皂苷產物，以及已被定義的轉醣酵素 UGT74M1、CYP93E1、UGT71G1、UGT73K1⁴⁴

1.4 研究目的

本論文研究，主要分為兩部分，第一部分為利用定點飽和突變對氧化鯊烯環化酵素進行結構、功能及機制上的探討；第二部分為利用 OSC 定點突變後的產物當作皂苷之轉醣酵素的受質，除了能對本實驗室所得到之眾多突變產物有更一步的應用及發展外，希望透過醣基化修飾反應的產物能應用於生物製藥領域。

1.4.1 對氧化鯊烯環化酵素進行定點飽和突變

過去近半世紀以來，氧化鯊烯環化酵素一直是科學家十分感興趣的研究課題，因其在固醇類合成途徑中扮演著重要的角色，且在生理及演化上也有一定的重要性，因此對於此酵素的環化機制與其胺基酸基團所具備的功能，值得做更深入的瞭解。在研究蛋白質結構與功能的領域中通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）來解出蛋白質結構。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（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。另外，我們所研究的酵母菌氧化鯊烯環化酵素是一種膜蛋白，分子量大加上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，且對於酵素催化機制的了解仍然有限。

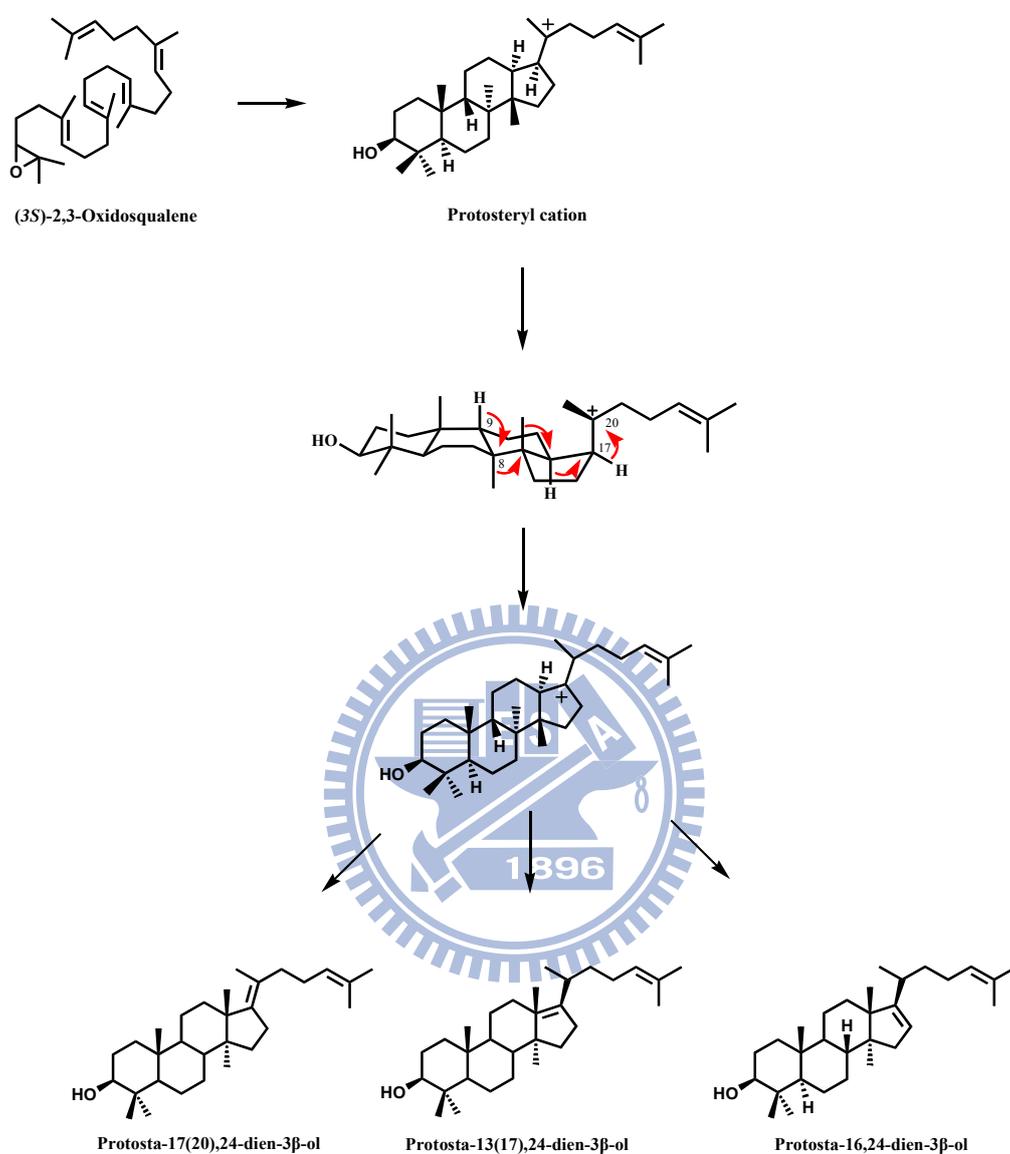
隨著1997年細菌的鯊烯環化酵素⁵⁸與2004年人類 OSC¹⁴ X-ray 結晶結構的解讀，提供我們更多對酵母菌 ERG7的了解，尤其是人類 OSC的結晶結構，透過這些資訊可以知道受質於酵母菌 ERG7的整個環化過程，以及在酵素活性區域的胺基酸基團扮演著辨識受質、穩定中間產物等十分重要的功能，所以近年來科學家也針對活性區域內的

假設活性胺基酸進行了許多突變實驗。利用突變對蛋白質進行研究已經在蛋白質工程及分子生物技術中很常被應用的方法，而最常見的為定點突變與隨機突變，定點突變通常是針對某個位置的胺基酸進行取代、刪除或嵌入，用以探討某個重要區段上特定胺基酸序列所執行的功能；而隨機突變是對蛋白質上的胺基酸序列不預設位置地進行突變，通常並不會知道被突變的位置，且突變的量之大而需先建構成一個突變株庫（library），再設計篩選方式從中挑選出所要的突變株。本實驗則是利用定點突變的方式對於酵母菌 ERG7進行結構、功能以及機制上的探討。



在實驗室先前的研究中，我們對酵母菌 ERG7位於活性區域中重要位置的 F699，以及鄰近 F699的 I705，進行定點飽和突變及其功能性的產物分析，因而得到了在 C-17cation位置脫氫的新產物，由 F699 的突變產物中分離出 protosta-13(17),24-dien-3 β -ol 和 protosta-17(20),24-dien-3 β -ol^{29,30}，I705 的突變產物中則分離出 protosta-16,24-dien-3 β -ol⁶⁴《圖1-23》。這些產物的取得意謂著對這兩個位置做突變會影響環化反應的進行甚至是中間產物的立體化學結構，而這些四環的中間產物及其立體化學的異構物，其亦是動物或植物的環化酵素在機制上一個重要的分叉點，因此我們認為環繞在這個連接四環骨架和支鏈的 C-17 cation位置，其鄰近胺基酸對於氧化鯊烯的

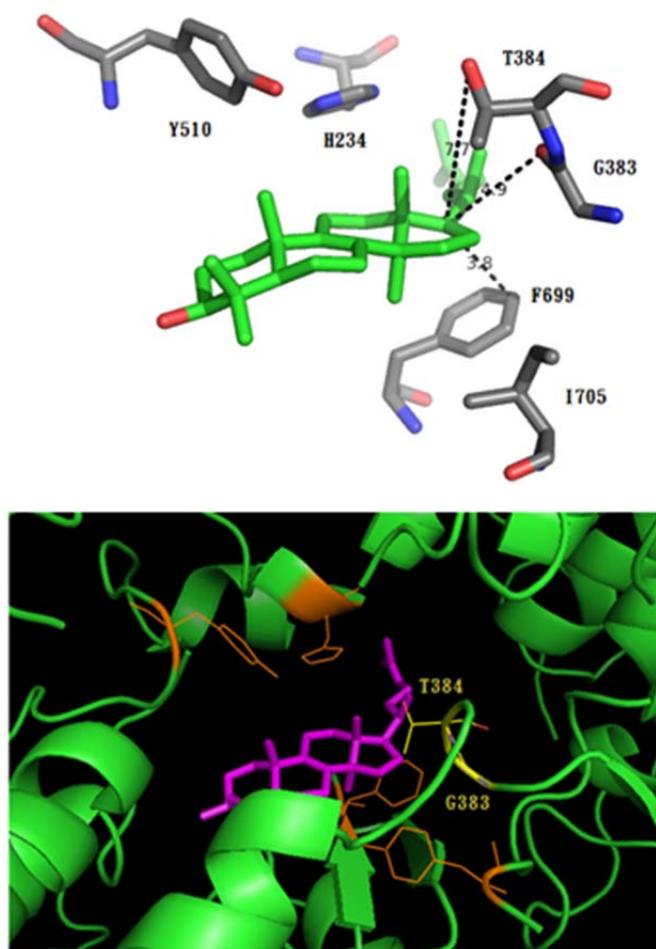
環化反應具有極其重要的關鍵性且令人想更深入探討。



《圖1-23》本實驗室目前已得到在C-17cation位置脫氫的新產物

隨著人類 OSC的 X-ray晶體結構在 2004 年被解開後¹⁴，我們便可利用此晶體結構做為模板，對其他物種之氧化鯊烯環化酵素的結構與反應機制進行更深入的研究，因此藉由電腦模擬酵母菌 ERG7的方式可以看出在活性區域中 C-17 cation位置附近的胺基酸《圖1-24》，

如前章節所述，F699對於穩定 C-17 cation扮演重要的角色，而 H234除了能穩定 C-14 cation，對於環化機制的最終步驟脫氫反應也是不可或缺的重要胺基酸。另外從蛋白質結構可以看出，C-17 cation位在環狀區域（loop regions）的一個轉彎處，而此轉彎處是由 G383和 T384組成。



《圖1-24》酵母菌ERG7活性區域中C-17 cation位置及其鄰近之胺基酸

關於 Gly383 和 Thr384 這兩個胺基酸，從產生環阿屯醇與產生羊毛硬脂醇之各物種中其環化酵素的序列比對來看《圖 1-25》，在 Thr384

的部分，Tyr 是高度保留在生成植物環阿屯醇的環化酵素 CAS 中，而 Thr 則是高度保留在生成真菌和哺乳類動物之羊毛硬脂醇的環化酵素 ERG7 中；在 Gly383 的部分，Gly 是高度保留在所有 CAS 和 ERG7 的蛋白質中，但在生成其他產物的其他物種環化酵素中的這個位置則是由其他胺基酸所取代¹⁷，像在產生 β -香桂素的 AMS 中是由 Ser 取代，而這種演化上的保留性是否對於反應機制上的意義有影響亦是一個值得討論的課題。

<i>AthCAS1</i>	G	M	K	M	Q	G	Y	N	G	S	Q	L	W	416
<i>PsaCAS1</i>	G	M	K	M	Q	G	Y	N	G	S	Q	L	W	416
<i>PgiCAS1</i>	G	M	K	M	Q	G	Y	N	G	S	Q	L	W	416
<i>GglCAS1</i>	G	M	K	M	Q	G	Y	N	G	S	Q	L	W	416
<i>LcyCAS1</i>	G	M	K	M	Q	G	Y	N	G	S	Q	L	W	424
<i>AsaCAS1</i>	G	M	K	M	Q	G	Y	N	G	S	Q	L	W	417
<i>DdiCAS1</i>	G	M	K	M	Q	G	Y	N	G	S	Q	L	W	369
<i>SceERG7</i>	G	M	T	I	M	G	T	N	G	V	Q	T	W	390
<i>CalERG7</i>	G	M	T	V	M	G	T	N	G	V	Q	V	W	384
<i>CcaERG7</i>	G	M	L	V	N	G	T	N	G	V	Q	C	W	412
<i>SpoERG7</i>	G	M	L	M	R	G	T	N	G	L	Q	V	W	385
<i>RnoERG7</i>	G	M	K	M	Q	G	T	N	G	S	Q	T	W	388
<i>HsaERG7</i>	G	M	K	M	Q	G	T	N	G	S	Q	I	W	387

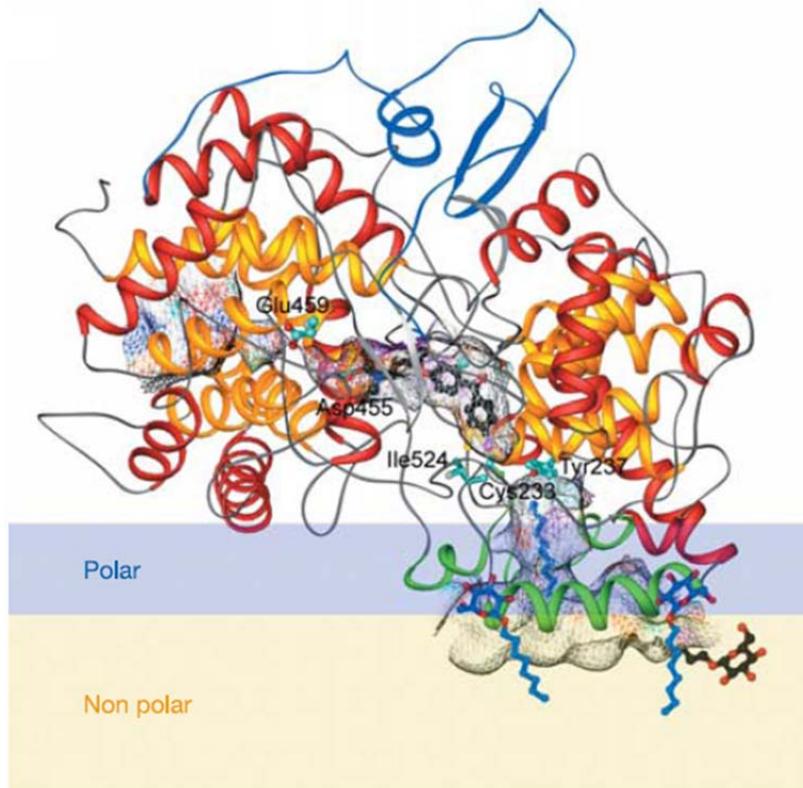
《圖1-25》 G383與T384在CAS和ERG7各物種間的序列比對¹⁷

A. thaliana (*Ath*), *Pisum sativum* (*Psa*), *Panax ginseng* (*Pgi*), *Glycyrrhiza glabra* (*Ggl*), *Luffa cylindrica* (*Lcy*), *Avena sativa* (*Asa*), and *D. discoideum* (*Ddi*)
S. cerevisiae (*Sce*), *Candida albicans* (*Cal*), *Cephalosporium caerulens* (*Cca*),
Schizosaccharomyces pombe (*Spo*), *Rattus norvegicus* (*Rno*), *Homo sapiens* (*Hsa*)

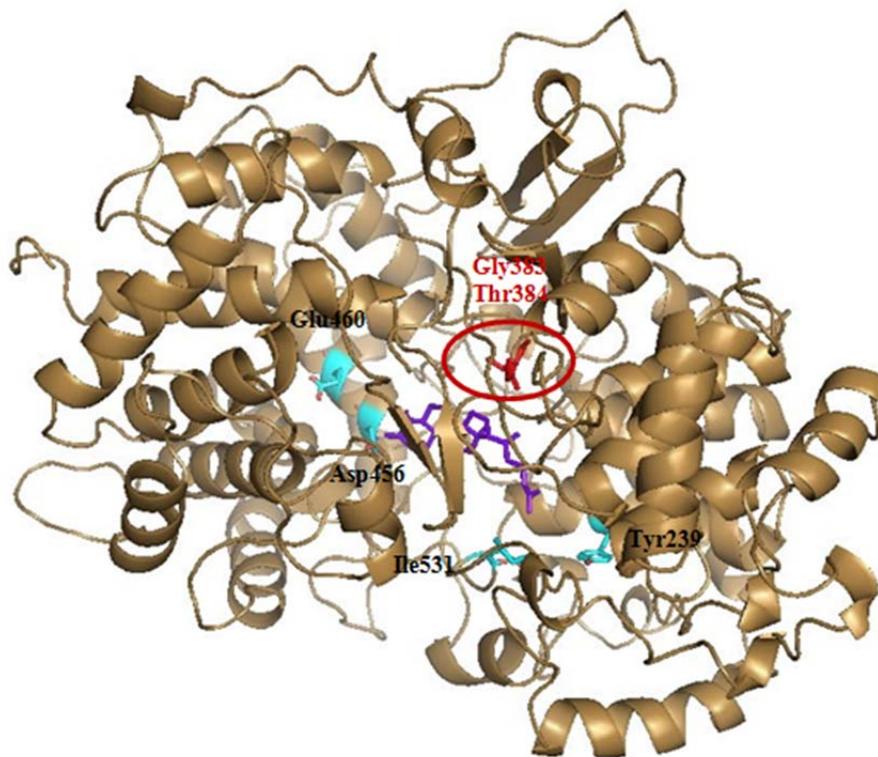
另外在先前的研究中，Matsuda 等人將 CAS 的 Tyr410 (在 ERG7 中為 Thr384) 突變成 Thr，使產物由原本的環阿屯醇轉變為羊毛硬脂醇、parkeol 以及新產物 9β -lanosta-7,24-dien-3 β -ol，其中羊毛硬脂醇

的比例佔了六成之多³⁸。而本實驗室之前的研究，嘗試將酵母菌 ERG7 高度保留的 Thr384、Gln450 和 Val454 突變成在 CAS 中序列位置相對應的 Tyr、His 和 Ile (*S. cerevisiae* ERG7^{T384Y/Q450H/V454I})，雖然沒有生成預期的環阿屯醇，但產物卻由羊毛硬脂醇完全轉變為 parkeol。個別對這三個突變點 (ERG7^{T384Y}, ERG7^{Q450H}, ERG7^{V454I}) 進行產物分析後，發現只有 ERG7^{T384Y} 會生成 parkerol 和其他四環產物 protosta-13(17),24-dien-3 β -ol, protosta-16,24-dien-3 β -ol⁶³。

最後我們利用發表在 Nature 期刊中的人類 OSC X-ray 晶體結構¹⁴《圖 1-26》，與酵母菌 ERG7 的蛋白質結構《圖 1-27》比對後發現，G383 和 T384 距離受質進出酵素的通道很近。基於以上種種因素更加深對這兩個胺基酸做進一步探討的動機，因此我們將 Gly383 和 Thr384 進行定點飽和突變，希望能藉此瞭解其與 C17-cation 之間的關係，以及酵素在環化機制上和對於活性區域甚至是整體蛋白質結構的影響。



《圖1-26》人類OSC與膜結合時的構形，圖中黑色為抑制劑Ro48-8071結合在活性區域的反應中心，透明網狀的部分為受質進出酵素的通道¹⁴



《圖 1-27》酵母菌 ERG7 的蛋白質結構，圈起來的部分為 Gly383 和 Thr384 所在位置

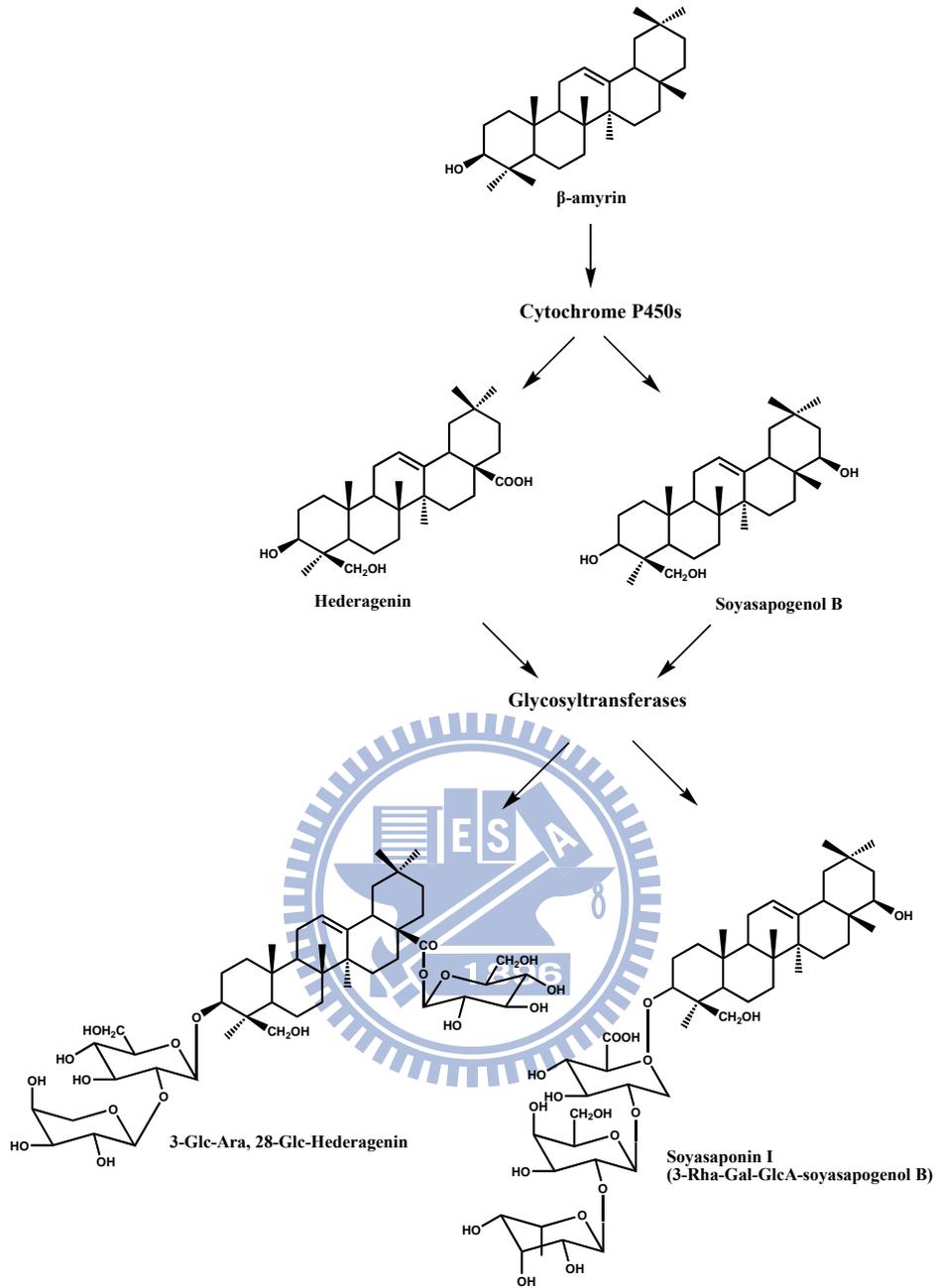
1.4.2 將 OSC 突變產物應用於轉醣酵素

研究目的第二部分為利用 OSC 定點突變後的產物當作皂苷之轉醣酵素的受質。本實驗室利用定點飽和突變技術探討酵母菌氧化鯊烯環化酵素的環化機制已經持續多年，此項研究日後的發展除了應用於抑制膽固醇與抗黴菌藥物外，對於經由突變後所得到的許多產物，也希望能在未來有其應用性及更多的發展。如前面皂苷簡介所提到的，皂苷具有溶血、抗黴菌、抗癌，以及作為疫苗佐劑等生物活性，且許多文獻報導也指出其生物活性的關鍵，推測與皂苷配基三萜類化合物上之 C3-OH 的醣基修飾有關，因此如果能將實驗室許多經酵母菌 ERG7 定點突變後所生成的四環產物，在其 C3-OH 的位置也接上醣基，是不是也能具有生物活性，這是個值得討論的課題。

由於植物所生成之皂苷具有多樣性，不管是皂苷配基的結構或者是醣基部分，所以推測其轉醣酵素的專一性可能不如其他酵素如此嚴謹，因此想嘗試藉此轉醣酵素將醣基轉移至經由 OSC 定點突變後所分離之四環產物的 C3-OH 上。目前已被定義的轉醣酵素很少，像是 UGT74M1, CYP93E1, UGT71G1, UGT73K1 等，而我們選用 Dixon 等人在 2005 年由蒺藜苜蓿 (*Medicago truncatula*) 的根部中所發現的轉醣酵素-UGT73K1，此酵素在蒺藜苜蓿中作用的受質為 Hederagenin、soyasapogenol B 和 soyasapogenol E⁵⁹ 《圖 1-28》。先前有提到皂苷的

醣基是由不同的轉醣酵素將醣一個一個接上去，而此篇報導在活性測試的部分，使用了 Hederagenin, soyasapogenol B 和 soyasapogenol E 作為受質，UDP-glucose, UDP-galactose 和 UDP-glucuronic acid 作為醣的材料，而實驗結果顯示 UGT73K1 轉移至皂苷配基上的醣基為葡萄糖⁵⁹。因此，我們的目標是純化出蛋白質 UGT73K1，希望藉由其將葡萄糖轉移到受質 C3-OH 的功能，使醣基接上四環的 OSC 定點突變後之產物，並進一步探討此化合物的生物活性。



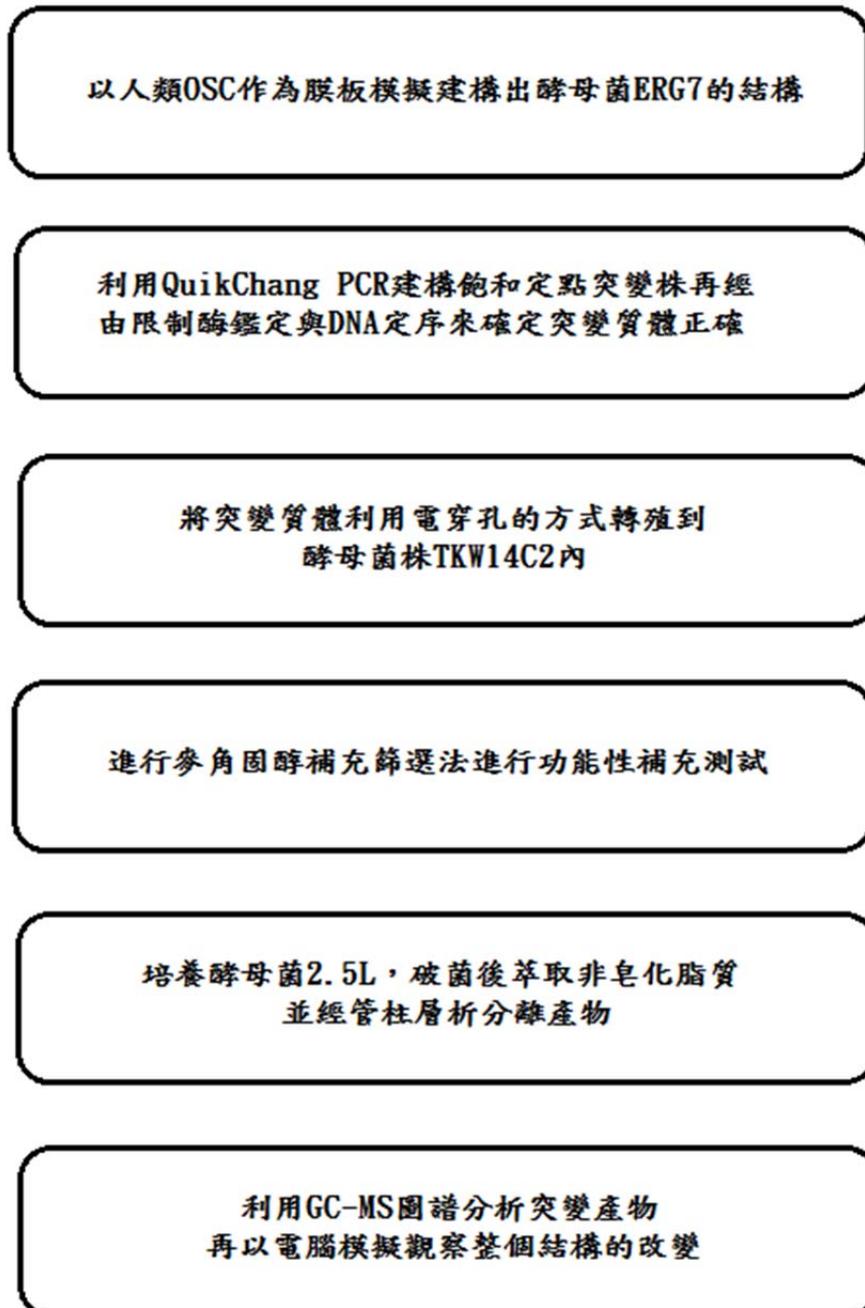


《圖 1-28》UGT73K1 在蒺藜苜蓿中的簡略合成途徑

第二章 實驗方法

2.1 對酵母菌 ERG7 進行定點飽和突變

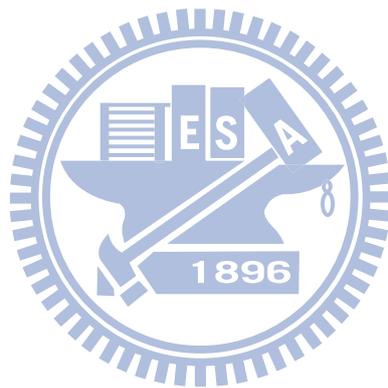
實驗流程

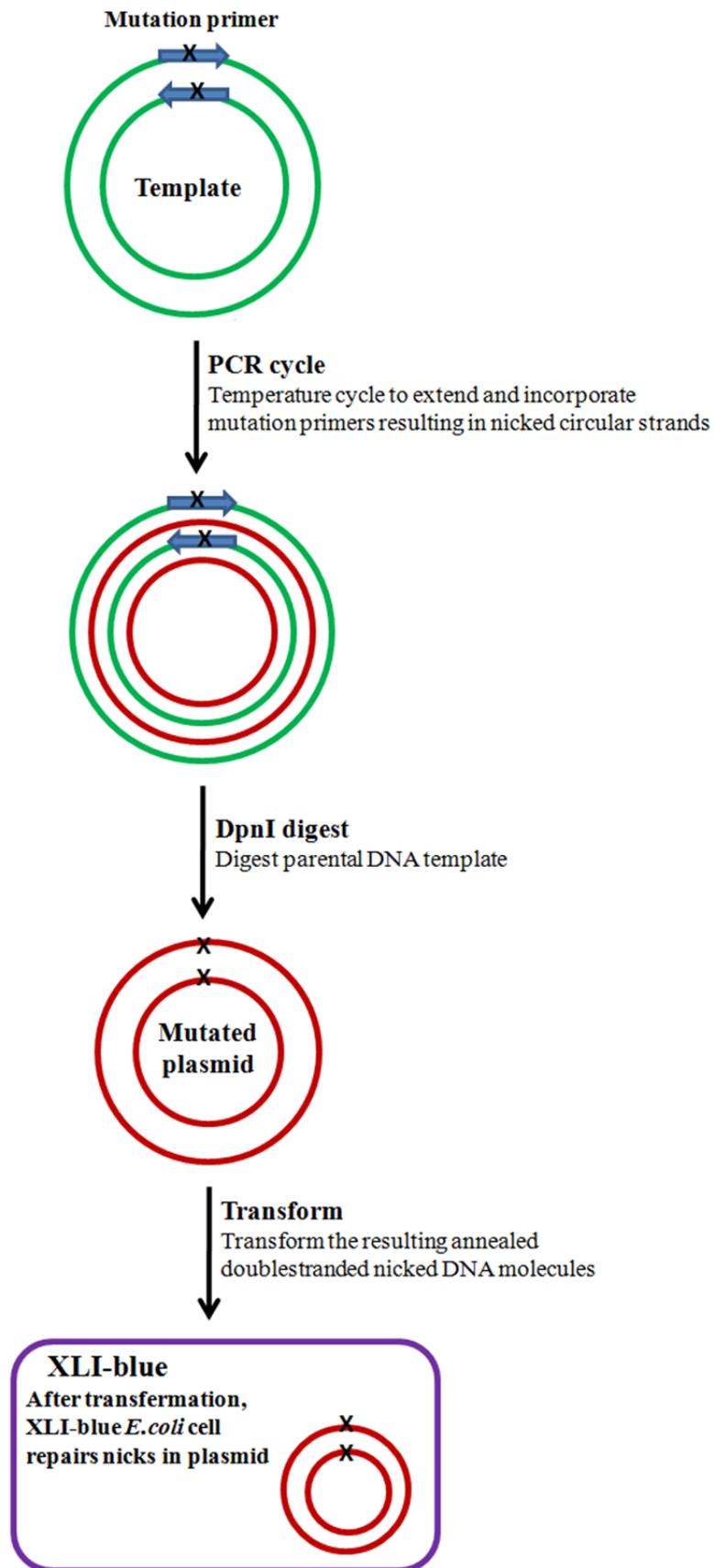


《圖 2-1》實驗流程圖

2.1.1 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 ERG7 質體作為模板，利用 QuikChange Site-direct mutagenesis 的方式《圖 2-2》，建構定點突變之質體。





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

(1) 引子設計：

將所要突變之胺基酸以粗體字表示，並在突變點之後設計一個靜默突變 (Silent mutation，灰色鋼底表示)，藉此增加一個切位 (下標線標示為切位序列) 作為酵素鑑定之用。如下表：

《表 2-1》酵母菌 $ERG7^{G383X}$ 定點飽和突變之引子設計

YOSC primer name	Sequence
YCC-YOSC-G383IKMNRST-BsrGI-1	5'-gAC CAT TAT g AN (C/g) AC AAA Tgg <u>TgT</u> ACA AAC CTg-3'
YCC-YOSC-G383CFLSWY-BsrGI-1	5'-gAC CAT TAT g TN (C/g) AC AAA Tgg <u>TgT</u> ACA AAC CTg-3'
YCC-YOSC-G383HLPQR-BsrGI-1	5'-gAC CAT TAT g CN (C/g) AC AAA Tgg <u>TgT</u> ACA AAC CTg-3'
YCC-YOSC-G383ADEGV-BsrGI-1	5'-gAC CAT TAT gg N (C/g) AC AAA Tgg <u>TgT</u> ACA AAC CTg-3'

《表 2-2》酵母菌 $ERG7^{T384X}$ 定點飽和突變之引子設計

YOSC primer name	Sequence
YCC-YOSC-T384IKMNRST-BsrGI-1	5'-gAC CAT TAT ggg AAN (C/g) AA Tgg <u>TgT</u> ACA AAC CTg-3'
YCC-YOSC-T384CFLSWY-BsrGI-1	5'-gAC CAT TAT ggg ATN (C/g) AA Tgg <u>TgT</u> ACA AAC CTg-3'
YCC-YOSC-T384HLPQR-BsrGI-1	5'-gAC CAT TAT ggg ACN (C/g) AA Tgg <u>TgT</u> ACA AAC CTg-3'
YCC-YOSC-T384ADEGV-BsrGI-1	5'-gAC CAT TAT ggg AgN (C/g) AA Tgg <u>TgT</u> ACA AAC CTg-3'

(2) QuikChange Site-Directed Mutagenesis

利用 Stratagene 公司所出品的 QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit，按照《表2-3》所列之材料條件混和均勻，再以《表2-4》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。

《表2-3》 QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit 之材料條件

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

《表2-4》 QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit 之聚合酶連鎖反應條件

segment	cycles	temperature	time
1	1	95 $^{\circ}$ C	2 min
2	25	95 $^{\circ}$ C	30 sec
		53 $^{\circ}$ C	1 min
		68 $^{\circ}$ C	8 min
3	1	68 $^{\circ}$ C	7 min
4	1	4 $^{\circ}$ C	∞

(3) *Dpn*I 酵素切除母股 DNA

將 PCR 產物以《表2-5》之條件放置在水浴槽中於 37 $^{\circ}$ 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。

《表2-5》 *DpnI*切除PCR產物DNA母股之條件

Reagent	Volume (μ l)
PCR products	12
10X NE Buffer 4	1.5
<i>Dpn I</i>	1.5

(4) 突變質體的放大與酵素鑑定

製備勝任細胞

取少許 XL1-Blue在含有 Tetracycline (100 mg/L) 的 LB Agar 培養皿上劃四區，於 37°C 培養箱一天後。由 Tetracycline/ LB Plate 上挑取單一菌落培養於含有 Tetracycline (100 mg/L) 的 3 ml LB 試管，同樣在 37°C 下於培養箱隔夜培養。接著將菌液接種於 1,000 ml 的 SOB培養液 (含有0.02 M的MgCl₂)，於震盪培養箱中以 37°C、250 rpm震盪條件培養 4至 5小時使其 OD600介於 0.5至 0.6之間。將菌液置於經高壓滅菌過之離心瓶中，並冰浴十分鐘，接著在 4°C 下以 4,100 rpm的條件離心十分鐘，待去除上清液之後以經高壓滅菌過之二次水清洗菌體，冰浴十分鐘後，再以 4,100 rpm、4°C 條件離心十分鐘。去除上清液後，以 320 ml TB buffer清洗 pellet，並重複上述條件離心之。倒除上清液後，以 80 ml TB buffer重新懸浮菌體，繼而加入 5.6 ml 的DMSO冰浴十分鐘。取 350 μ l 菌液置於經高壓滅菌後的微量小管中，丟入液態氮急速冷凍，保存於 -80°C 冰箱即可。

DNA的轉殖與放大以及限制酶鑑定

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 $1\ \text{ml}$ 的 LB 試管中，以 37°C 、 $200\ \text{rpm}$ 震盪條件培養一小時後，將菌液以 $8,000\ \text{rpm}$ 的條件離心一分鐘並去除上清液，接著在無菌環境下將菌液塗在 LB plate (with Ampicillin 100mg/l)，在 37°C 下培養約 16小時後挑取單一菌落培養於 $3\ \text{ml}$ 的 LB tube (with Ampicillin 100mg/L)，於 37°C 、 $200\ \text{rpm}$ 震盪條件下培養 12 小時即可抽取放大之質體 DNA。

將放大抽取所得之含有突變的質體 DNA，依《表 2-6》所示條件，將設計用於鑑定之限制酶與特定緩衝液混和，並置於 37°C 水域槽中反應四小時，再以 DNA 電泳來確定質體是否含有所設計之突變點。

《表 2-6》特定限制酶鑑定之材料條件

Reagent	Volume (μl)	Volume (μl)
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 Sangerdideoxynucleotide chain termination 進行定序。首先利用 BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit 以《表2-7》所示之材料依廠商所附之溫度條件下進行聚合酶連鎖反應，其引子為 CTL-YOSC-C457ADEGV-AlwnI-2 (5'-CTT CTg CAg T(g/C)N CAT CAg CCA CTg TAT AgC C-3')。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。

《表 2-7》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

2.1.2 酵母菌株 TKW14C2 的電穿孔作用

於 -80°C 冰箱中取出 TKW14C2 菌株 (MATa or MATα *ERG7Δ::LEU2 hem1Δ::G418 ade2-101 his3Δ-200 leu2-Δ1 lys2-801 trp1-Δ63 ura3-52*)，由於 TKW14C2 是不具有正常的 *ERG7* 功能 (即不含有 *ERG7* 基因) 且 *Heme* 基因已被置換掉的酵母菌，因此培養液需要額外補充 Hemin + Ergosterol + Met (胺基酸Methionine 在體內的生

合成與 *Heme* 基因相關，當 *Heme* 基因被置換掉時，Methionine 的生合成會受影響，故要額外補充)。將其接種於 3 mL 的 YNB (含有 amino acids (Ade、Lys、His、Met、Uracil) / hemin/ Ergosterol/ Glucose) 試管在 30°C 培養箱中以 250 rpm 震盪條件培養約三天。繼而將菌液倒入 100 mL 含有相同培養液條件下培養至其 OD600 值介於 1 至 1.5 之間，之後將全部菌液以 3,000 rpm、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水 (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、4°C 條件下離心十分鐘並倒除上清液。最後加入 50 μ L \times n (n 為所需轉殖的樣品數目) 之 D-sorbitol 溶液。之後取 50 μ L 菌液混和 5 μ L 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 μ F 以進行電穿透作用。在電擊後立刻加入 500 μ L 無菌的 1M D-sorbitol 溶液將細胞懸浮混勻，最後取 120 μ L 的菌液塗佈在 YNB plate 中 (含有 amino acids (Ade、Lys、His、Met、Uracil) / Hemin/ Ergosterol/ Glucose)，於 30°C 培養箱中培養 3 至 5 天後待其菌落生長即可進行功能性補充篩選分析。

2.1.3 功能性補充篩選

使質體轉植到 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 acids (Ade、Lys、His、Met、Uracil) + Hemin (實驗組) 與 Glucose + amino acids (Ade、Lys、His、Met、Uracil) + 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。



2.1.4 酵母菌的培養

從麥角固醇補充篩選培養皿上挑取含有突變之菌落，並接種於 3 ml 的 YNB 溶液中 (含有 Glucose/ amino acids (Ade、Lys、His、Met、Uracil) / Hemin/ Ergosterol，若酵母菌 ERG7活性則不加 Ergosterol) 於 37°C、250 rpm 震盪條件下培養約三天。將試管底部菌體重新懸浮均勻，再把菌液到入 100 ml 無菌之相同培養液並於同樣環境下培養二至三天。同樣地將菌體懸浮均勻後置入 2.5 L 經高壓滅菌過之相同培養液，在 37°C、250 rpm 下震盪培養一個禮拜即可。

2.1.5 非皂化脂質的萃取

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

2.1.6 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：5% 乙酸乙酯 (Ethyl acetate ; EA) 和 95% 正己烷 (Hexane) 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 R_f 值之試管溶液收集在一起，以迴旋濃縮機濃縮後即可利用 GC-MS (氣相層析-質譜儀) 作進一步分析，詳細步驟如下。

首先將適量矽粉與 100 ml 的正己烷互相混和攪拌均勻後，倒入管柱中填充管柱並以幫浦壓實緊密。接著將樣品溶於二氯甲烷

(CH_2Cl_2) 中，在不破壞矽粉層表面情況下小心加入管柱中。接著以 5% 乙酸乙酯與 95% 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 片將其相同 Rf 值之試管收集即可以迴旋濃縮機濃縮。

2.1.7 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鋁片薄層平版 (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 0.5 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% 乙酸乙酯混和 80% 正己烷做為展開劑進行平板展佈。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。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。

2.1.8 氣相層析-質譜儀 (GC-MS) 的條件

氣相層析儀使用 Agilent 6890N 型號，管柱選用 Agilent 122-5731DB- 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 (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 1300°C，並持續 8 分鐘，總時間為 34 分鐘，搭配質譜 (MS) 儀做為訊號偵測器。MS 使用 Agilent Technologies Model 5973MSD 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。

2.1.9 突變電腦模擬圖的建構

由於目前 *SceERG7* 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。

2.2 蒺藜苜蓿 (*Medicago truncatula*) 之轉醣酵素 UGT3K1

接下來將對第二部分的實驗，如何取得 UGT73K1 蛋白質進行實驗方法的介紹。



2.2.1 合成 UGT73K1 基因序列

先於 NCBI 資料庫中搜尋 UGT73K1 的完整核苷酸序列，接著在序列的首端和末端分別加上限制酶 *Bam*HI 和 *Not*I 的切位序列，此目的是為了要與載體 pET28a 連接，以繼續之後表現蛋白質實驗之用。核苷酸序列確定後交由 Mr. Gene 有限公司 (Regensburg, Germany) 做合成。核苷酸序列如下 (切位以粗體表示)：

```
5'-CgCAgggATCCATgggAACAgAATCCAAACCATTgAAAATCTACATgCTCC  
CATTTTTTgCACAAggACACTTAATCCCTCTTgTAAACTTAgCTCgATTAgTAG  
CATCCAAAAACCAACATgTAACCATCATAACAACACCTTCAAATgCTCAAC
```

TCTTCgATAAAACAATCgAAgAAgAAAAgCCgCCggCCACCATATCCgCgTC
CATATCATCAAATTCCCATCAgCCCAACTCggTCTACCTACCggCgTTgAAAA
TCTTTTCgCTgCTTCCgATAACCAAACCTgCCggTAAAATTCACATggCTgCTCA
TTTCgTTAAAgCggATATTgAAgAgTTCATgAAAgAAAACCCgCCTgATgTgTTT
ATTTcggATATCATCTTCACCTggAgTgAATCCACTgCgAAAAACCTTCAAAT
TCCACggCTTgTTTTAAACCCgATTTCAATTTTCgATgTTTgTATgATCCAAgCT
ATACAATCTCATCCCgAATCTTTTgTTTCTgATTCgggACCTTATCAAATTCA
CggTCTACCTCATCCTCTTACACTTCCATTAAACCATCACCAggTTTCgCTA
gACTCACAgAATCACTTATAgAAgCTgAAAATgATTCTCATggCgTgATCgTTA
ATAgCTTCgCTgAACTTgACgAAggTTACACAgAATATTATgAgAATCTCACCG
gACggAAggTTTggCATgTgggACCAACTTCTCTAATggTggAAATTCCCAAAAA
gAAgAAAgTAgTgAgTACTgAAAATgATTCCTCTATCACgAAACACCAgAgTC
TCACTTggCTCgATACTAAggAACCAAgTTCggTTCTTTACATTAgCTTCgggAg
TTTATgTCgTTTATCAAACgAACAACTTAAggAgATggCTAATggAATCgAAgC
gTCAAAGCATCAATTCCTTTgggTggTTCATggAAAAGAAggAgAAgATgAAgAT
AATTggTTACCAAAAggTTTTgTAgAgAggATgAAggAAgAAAAGAAggAATgT
TgATTAAAggATgggTTCCACAAgCgTTAATATTggATCATCCATCgATAggCgg
ATTCTTAACgCATTgTggCTggAACgCgACCgTggAAgCAATAAgTTCCggAgTA
CCAATggTTACAATgCCCggATTCggggATCAATATTACAACgAgAAATTggTg
ACTgAggTgCATCgCATTggCgTggAAgTTggCgCCgCggAgTggAgCATgTCgCCT
TATgATgCTAAgAAgACAgTggTgAgAgCTgAAAggATAGAGAAAgCTgTgAAg
AAATTgATggATAgTAATggTgAAggTggAgAAATAAgAAAAgggCTAAAgAA
ATgAAAgAgAAAgCATggAAAgCTgTTCAAgAAggTggATCATCgCAAAATTgT
CTTACAAAACCTTgTTgATTACCTTCATAgTgTggTAgTTACCAAATCAgTggAg
CTAAACTAggCggCCgCAAAAggAAAA -3'

2.2.2 質體 DNA 的放大與酵素鑑定

從 -80°C 冰箱中取出勝任細胞於冰上緩慢解凍，取 $1\ \mu\text{L}$ 由 Mr. Gene 公司合成後之質體 DNA，加入 $60\ \mu\text{L}$ 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 的水浴一分鐘後，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 $3\ \text{mL}$ 的 LB 試管（含 Kanamycin 25mg/mL ），於 37°C 、 $200\ \text{rpm}$ 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。將放大抽取所得的質體 DNA，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 DNA 經由限制酶反應後的片段大小是否正確。



2.2.3 建構表現質體

將 Mr. Gene 公司合成之質體 DNA 與載體 pET28a(+)先以 *NotI* 限制酶切割 3 小時後，再加入 *BamHI* 限制酶切出所需要連接的基因片段與載體，接著利用 T4 DNA 接合酶將基因片段與載體進行接合作用，於 16°C 反應 6 小時，所得之重組質體為 pET28a(+)/UGT73K1。接著一樣利用上述 2.2.2 之方式對 pET28a (+) / UGT73K1 進行放大與酵素鑑定，而在挑取單一菌落培養於 $3\ \text{mL}$ 的 LB 試管（含

Kanamycin 25mg/mL) 前，會把所挑取的單一菌落先劃眉於 LB plate 上再放入 LB 試管中，兩者同樣在 37°C 培養箱中培養 16 小時，酵素鑑定完正確後即可將此 LB plate 送交廠商（明欣生物科技有限公司）做重組質體之定序。

2.2.4 重組質體於大腸桿菌之表現

所建構之重組表現質體以 42°C 熱休克方式送入大腸桿菌 BL21 (DE3) 勝任細胞中。挑選出帶有表現載體的菌落，將之培養於含有 25mg/mL Kanamycin 的 3 ml LB 試管中，於 37°C 進行隔夜振盪培養，次日將之於無菌操作下倒入已高壓滅菌過的 500 mL LB 培養液中，於 37°C 振盪培養至菌液濃度達吸光值（波長 600 nm）為 0.7 時，始加入 0.5 mM 的異丙基硫化半乳糖苷（isopropyl β -D-thiogalactopyranoside, IPTG），置於 20°C 進行隔夜振盪培養，以誘發重組蛋白質之生合成。隨後以 4000 g 離心 10 分鐘收取細胞，使細胞懸浮於冰冷之 binding buffer（20 mM Tris、500 mM NaCl，pH 7）中。將樣品置於冰上並以超音波振盪（sonication）方式打破細胞，於 4°C 以 11000 g 離心 30 分鐘後，分別收取菌體及上清液進行 SDS-PAGE 分析，並利用鎳離子層析管柱來分離純化。

2.2.5 金屬離子親和性管柱層析

取總體基為 20 mL 的塑膠管柱，加入 Ni-NTA 樹脂 (Ni-NTA His-Band[®] Resin) 2 mL，利用上述之 binding buffer (20 mM Tris、500 mM NaCl, pH 7) 平衡管柱後。將破菌後之上清液緩慢加入，分別以含有不同 imidazole 濃度的 washing buffer (20 mM Tris、500 mM NaCl、50 mM imidazole, pH 7)、(20 mM Tris、500 mM NaCl、100 mM imidazole, pH 7)、(20 mM Tris、500 mM NaCl、500 mM imidazole, pH 7) 沖提，將與樹脂上之鎳離子結合的重組蛋白析出，收集完畢後分別取樣做蛋白質濃度測試與 SDS-PAGE 蛋白質電泳分析。

2.2.6 蛋白質的分子量與純度分析

配置適當比例的電泳膠片《表 2-8》，取出純化之蛋白質溶液與樣品緩衝液為 4:1 的體積比例混合，在 95°C 水浴下加熱 5 分鐘後，柱入於膠片上端的樣品凹槽內。先固定以 90 伏特的電壓進行電泳，當染劑 (Dye) 到達 separating gel 層後，再將電壓增加到 120 伏特，之後通電壓約 1~1.5 小時，待染劑至膠片底端後即完成。以膠片染色液 (0.1 % Coomassie blue R-250) 染色約 30 分鐘後，再以脫色溶液 I (Destain solution I) 去除染色約 20 分鐘，再移至脫色溶液 II (Destain solution II)，直到膠片的藍色背景完全去除呈現透明狀為止。

《表 2-8》12.5 % separating gel (上) 及 5 % stacking gel (下) 電泳膠片的配方

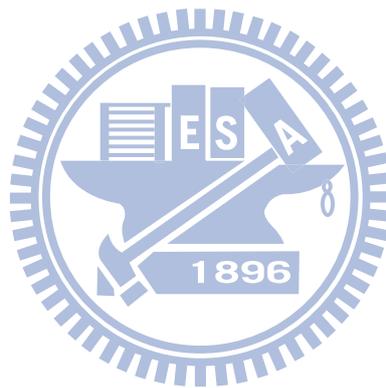
30 % acrylamide / 1 % bis-acrylamide	8 mL
1.5M Tris-buffer (pH 8.8)	5 mL
20 % SDS	100 μ L
dd H ₂ O	6.8 mL
10 % APS	100 μ L
TEMED	10 μ L
Total amount	20 mL

30 % acrylamide / 1 % bis-acrylamide	1.3 mL
1M Tris-buffer (pH 6.8)	1.25 mL
20 % SDS	50 μ L
dd H ₂ O	7.35 mL
10 % APS	50 μ L
TEMED	10 μ L
Total amount	10 mL

2.2.7 蛋白質濃度測量

對於蛋白質濃度測定，所採用的方式是 BCA (bicinchoninic acid) assay 技術，BCA assay 類似於 Lowry 反應，但是以 BCA 試劑取代 Folin-Cocalteu 試劑，在鹼性環境下藉由蛋白質可使二價銅離子還原成一價銅離子，而兩個 BCA 分子則會與一價銅離子形成錯合物，在波長 562 nm 下產生明顯的紫色，利用光譜儀的分析則能夠以吸收值的大小判斷溶液中蛋白質濃度的多寡。以商業化產品 BCA proteins assay kit 進行蛋白質濃度測量，取出蛋白質溶液樣品 20 μ L 於 96-well ELISA plate 之中，加入已混合均勻的 BCA 試劑 180 μ L (Reagent A/B

= 50/1 的比例)，置於 37°C 下反應 20 分鐘，測量溶液在波長 560 nm 時的吸收值變化；同時，先配置好八個不同濃度的已知 BSA 標準溶液，可定出一線性的標準曲線 (linear standard curve)，而所測得的吸收值則可用內插法的方式，換算為對應蛋白質的濃度。



第三章 實驗結果與討論

3.1 酵母菌 $ERG7^{G383X}$ 與 $ERG7^{T384X}$ 功能性分析

3.1.1 建構 $ERG7^{G383X}$ 與 $ERG7^{T384X}$ 的定點飽和突變株

我們依照第2.1.1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（Gly383與Thr384）分別設計成 AN(C/g), TN(C/g), CN(C/g), gN(C/g) 序列，用以建構其他 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 *Bsr*GI 多一個辨認切位。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其進行聚合酶連鎖反應。

3.1.2 $ERG7^{G383X}$ 與 $ERG7^{T384X}$ 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。由功能性篩選表中，可以發現當 Gly383 位置換成比較小(Ala, Ser, Pro)和帶電(Asp, Asn)的胺基酸時可使菌株存活，其餘胺基酸則會

造成菌株死亡《表 3-1》。而當 Thr384 位置換成帶有大取代基 (Trp, Lys, Arg) 和具有二級結構的胺基酸 Pro 時，會導致其酵素失活《表 3-2》。利用此篩選方式可找出對於 Gly383 和 Thr384 在 ERG7 的環化機制中，扮演關鍵性角色的胺基酸取代。

《表 3-1》酵母菌 ERG7^{G383X} 功能性篩選

Substitutions for Gly383		BsrGI mapping	Sequence confirmation	Ergosterol supplement
Polar	Cys (C)	V	V	—
	Ser (S)	V	V	+
	Thr (T)	V	V	—
	Met (M)	V	V	—
Nonpolar	Ala (A)	V	V	+
	Val (V)	V	V	—
	Leu (L)	V	V	—
	Ile (I)	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	—

《表 3-2》酵母菌 ERG7^{T384X} 功能性篩選

Substitutions for Thr384		BsrGI mapping	Sequence confirmation	Ergosterol supplement
Polar	Cys (C)	V	V	+
	Ser (S)	V	V	+
	Met (M)	V	V	+
Nonpolar	Gly (G)	V	V	+
	Ala (A)	V	V	+
	Val (V)	V	V	+
	Leu (L)	V	V	+
	Ile (I)	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	+
	His (H)	V	V	+
Basic group	Lys (K)	V	V	-
	Arg (R)	V	V	-

3.1.3 ERG7^{G383X} 與 ERG7^{T384X} 突變株產物分析

經過功能性的篩選後，我們利用第 2.1.4~2.1.7 章節中所敘述的方法進行 ERG7^{G383X} 和 ERG7^{T384X} 突變株的產物分析，並由 GC-MS 來鑒定產物和分析其比例《表 3-3》、《表 3-4》。

從《表 3-3》可以發現，當 ERG7^{G383X} 突變成 Ala 和 Ser 時，產

物還是一樣只會生成羊毛硬脂醇，由 Pro 取代時則多了四環產物 Protosta-16,24-dien-3 β -ol，比較特別的是當 Asp 和 Asn 取代後，除了 Protosta-16,24-dien-3 β -ol，還會產生三環產物，而突變成其餘的胺基酸都會使酵素失去活性。由於有活性之突變株其產物生成的比例有八成以上都是羊毛硬脂醇，因此 Gly383 在酵素活性區域中，對於維持蛋白質結構應該是個具有關鍵性的位置。

在 ERG7^{T384X} 的部分《表 3-4》，四個會使酵素失去活性的突變株中，Lys 取代會產生大量的單環產物和少許四環產物，至於其他致死的三個胺基酸取代 (Trp, Arg 和 Pro)，則完全沒有 m/z 值為 426 的產物。在其它的胺基酸取代中，Asp, Phe 和 His 會有單環產物 Achilleol A 的產生，整體而言，對 ERG7^{T384X} 進行定點飽和突變，除了羊毛硬脂醇外還會有許多四環產物的產生，尤其是 Parkeol，而在許多胺基酸取代突變中也可以看到三環產物 (13 α H)-isomalabarica-14(26),17E,21-trien-3 β -ol 的生成。從產物分析表可以得知其產物生成具有很高的多樣性，因此 Thr384 在酵素環化機制中，對於穩定碳陽離子中間物及最後的脫氫反應，似乎扮演著重要的角色。

《表 3-3》酵母菌 ERG7^{G383X} 的產物分析表：Lanosterol (1)；
 Protosta-16,24-dien-3 β -ol (2)；
 (13 α H)-isomalabarica-14(26),17E,21-trien-3 β -ol (3)；
 (13 α H)-isomalabarica-14Z,17E,21-trien-3 β -ol (4)；
 (13 α H)-malabarica-14E,17E,21-trien-3 β -ol (5)

	Substitutions for Gly383	Product percentage(%)				
		1	2	3	4	5
Live	Ala (A)	100				
	Ser (S)	100				
	Pro (P)	98.3	1.7			
	Asp (D)	89.8	1.6		5	3.6
	Asn (N)	85.6	7.75	6.65		
Die	Cys (C), Met (M), Thr (T), Val (V), Leu (L), Ile (I), Gln (Q), Phe (F), Tyr (Y), Trp (W), Glu (E), His (H), Lys (K), Arg (R)					

No product

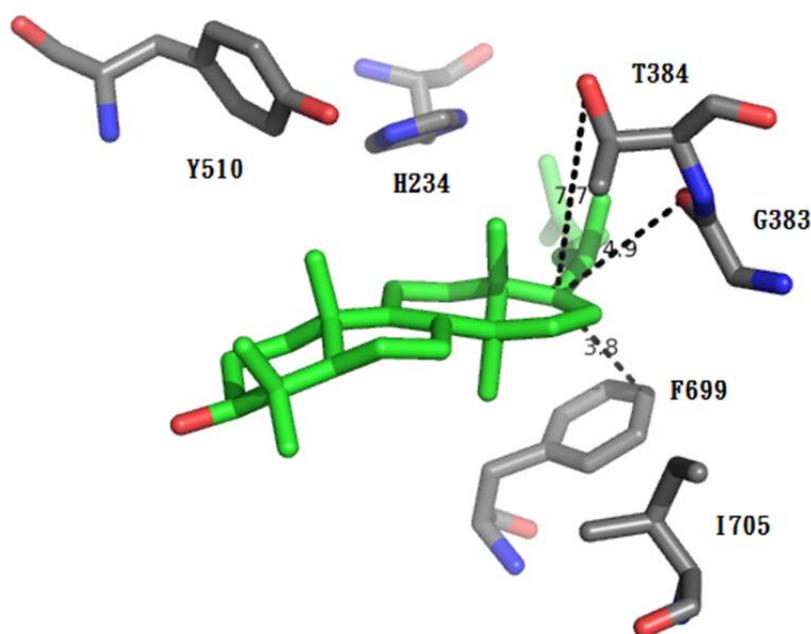
《表 3-4》酵母菌 $ERG7^{T384X}$ 的產物分析表：Lanosterol (1)；Parkeol (2)；
 9β -lanosta-7,24-dien-3 β -ol (3)；Protosta-16,24-dien-3 β -ol (4)；
 Protosta-13(17),24-dien-3 β -ol (5)；
 (13 α H)-isomalabarica-14(26),17E,21-trien-3 β -ol (6)；Achilleol A (7)；
 N.D. (No product)

Substitutions for Thr384		Product percentage(%)						
		1	2	3	4	5	6	7
Polar	Cys (C)	74	15.5				10.5	
	Ser (S)	43.7		26.25	4.9		25.15	
	Met (M)	84.2	10.8				5	
Nonpolar	Gly (G)	28.9			5.15		65.65	
	Ala (A)	71.7			4.25		24.05	
	Val (V)	37	61.6			0.5	0.9	
	Leu (L)	60.5	39.5					
	Ile (I)	78.05	21.95					
	Pro (P)							No product.
Amide group	Asn (N)	29.45	9.95		9.95		45.35	5.3
	Gln (Q)	33.6	37.9	20.75			7.75	
Aromatic group	Phe (F)	82.35				2		15.65
	Tyr (Y)	45.5	27.7	23.4	2.1	1.3		
	Trp (W)							No product
Acidic group	Asp (D)	70.95	11.45		1.85		15.7	
	Glu (E)	76.6	23.4					
Basic group	His (H)	10.65	76.55				3.25	9.55
	Lys (K)	28.7	2.9					68.4
	Arg (R)							No product

3.1.4 $ERG7^{G383X}$ 與 $ERG7^{T384X}$ 突變株電腦模擬分析

我們利用 2.1.9 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 活性區域胺基酸的相對空間位置，以進行酵母菌 ERG7 的結構分析。《圖 3-1》顯示當以羊毛硬脂醇為受質時，Gly383 和 Thr384 的位置與其他幾個在酵素活性區域中具有重要功能的胺基酸。像是 Phe699 已由實驗證實可利用其芳香族基團的碳陽離子- π 電子作用來穩定 C-17 cation 中間物；而 His234 和 Tyr510 則可產生氫鍵互相拉扯作用來穩定環化機制中最後的脫氫反應。由產物分析結果發現，當酵母菌 Gly383 和 Thr384 位置以不同屬性的殘基進行取代時，會改變其產物的分佈，以下將對酵母菌突變株 ERG7^{G383X} 和 ERG7^{T384X} 分別進行討論。



《圖 3-1》野生型酵母菌 ERG7^{G383} 和 ERG7^{T384} 與附近胺基酸之結構模擬圖

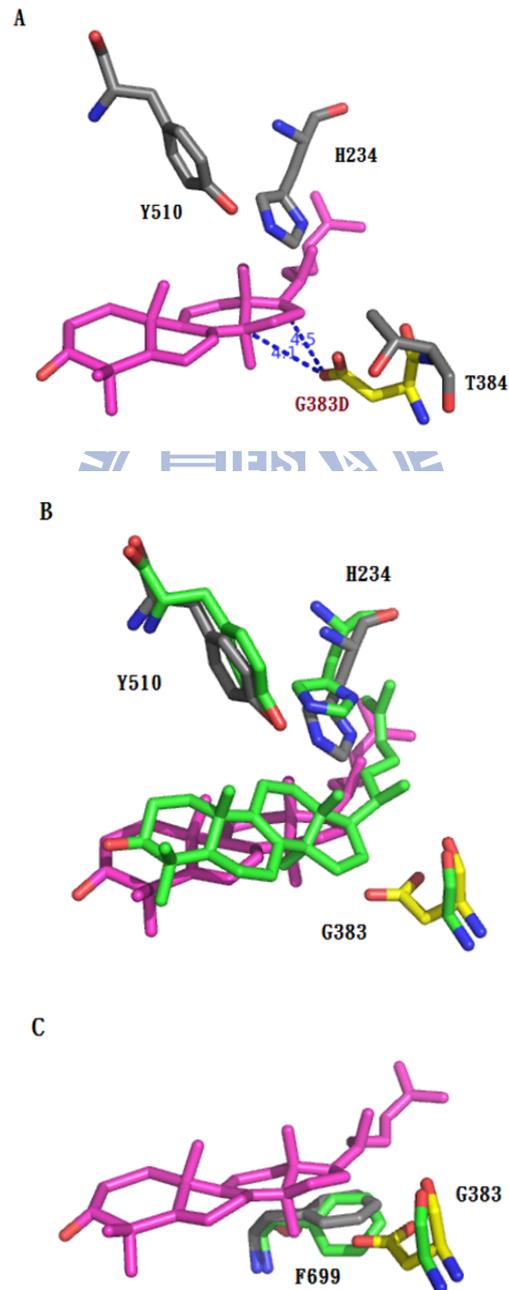
3.1.4.1 ERG7^{G383} 與受質間的關係

先前有提到在各物種產生四環產物羊毛硬脂醇的ERG7和環阿屯醇的CAS中，其序列比對Gly383在這個位置都是高度保留的狀態。而在酵母菌ERG7^{G383X}突變株中，我們所得到的結果大致上是除了比較小的胺基酸（Ala, Ser, Pro）外，其餘所有的突變株都會導致酵素失去活性，比較特別的是當突變成Asp和Asn時，酵素不但可產生大量的羊毛硬脂醇，甚至還有三環產物的生成。因此我們將以ERG7^{G383D}和ERG7^{G383N}突變株與野生型ERG7的電腦模擬圖為例，加以比較並進行探討。

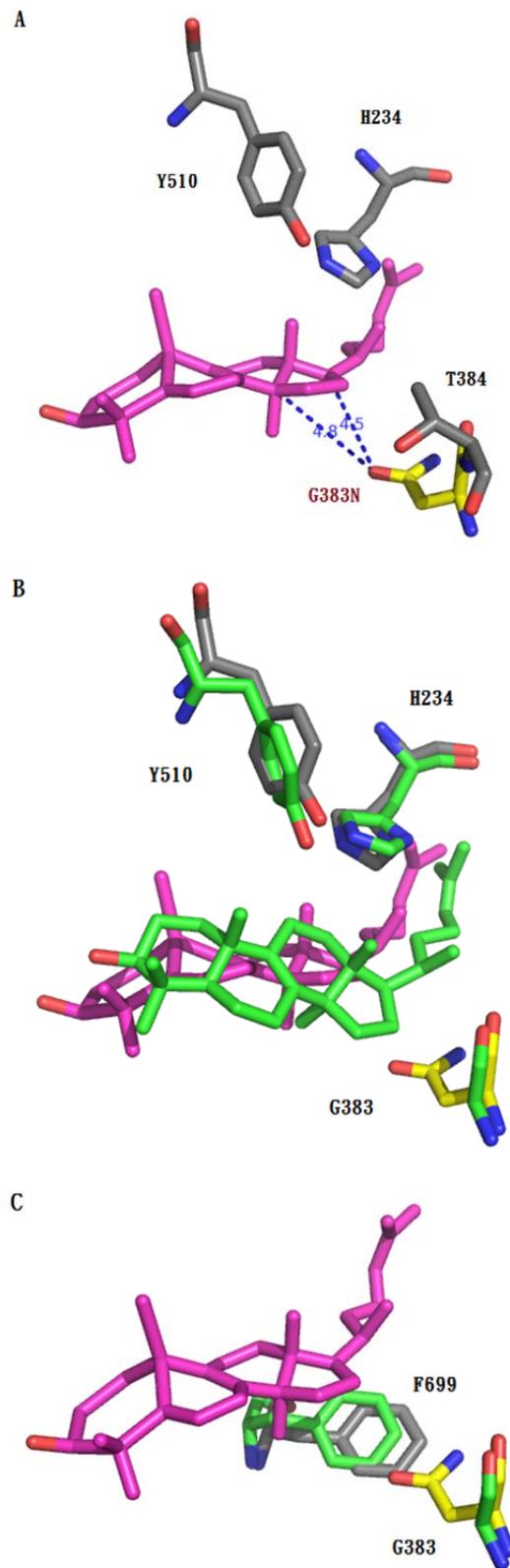


從《圖3-2A、B和C》可以看出當Gly383突變成Asp時，其帶有電荷的酸基側鏈伸向了活性區域中，且受質羊毛硬脂醇、His234和Phe699的位置都有明顯的改變。當Gly383突變成Asn時也可以看到類似的情況《圖3-3A、B和C》，其醯胺基側鏈也伸向了活性區域中，且受質的偏轉幅度很大。而由這些模擬結構圖我們推測，對Gly383進行突變會影響酵素受質甚至是鄰近胺基酸在活性區域中的位置，所以當帶有較大官能基和側鏈的殘基取代時，可能會改變酵素活性區域中的結構，使受質無法進入或使環化機制受到阻礙而導致酵素失活。但當Gly383突變成Asp和Asn時，雖然改變了受質和鄰近胺基酸的位置，但這樣的改變似乎是此酵素仍然具有活性的原因，透過模擬圖

可以發現不管是 $\text{ERG7}^{\text{G383D}}$ 還是 $\text{ERG7}^{\text{G383N}}$ ，其與C-14及C-17 碳陽離子的距離都跟野生型 ERG7 差不多，這表示或許對於Gly383這個位置，胺基酸與受質間的適當距離不會中斷活性區域中的環化反應但因為突變後殘基所帶的官能基不同而對環化機制造成影響。



《圖 3-2》酵母菌 $\text{ERG7}^{\text{G383D}}$ 結構模擬圖，野生型 ERG7 結構以綠色表示



《圖 3-3》酵母菌 ERG7^{G383N} 結構模擬圖，野生型 ERG7 結構以綠色表示

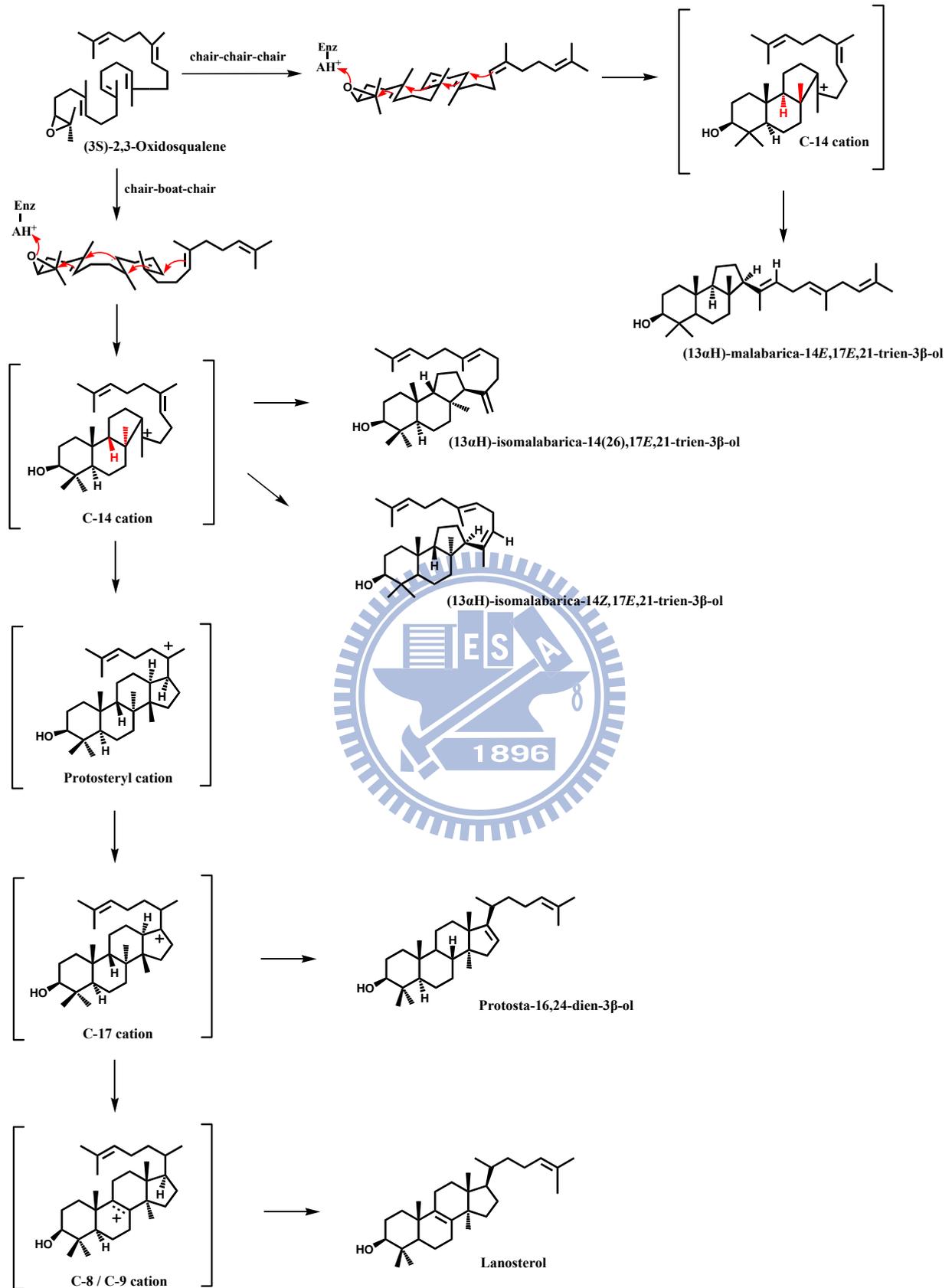
3.1.4.2 ERG7^{G383X} 環化過程及生合成途徑推測

前面提到了 Gly383 這個距離受質通道很近，且位於酵素環狀區域 (loop) 的胺基酸，對於穩定酵素活性區域的結構似乎扮演很重要的角色。而從分析表和模擬結構圖也可以觀察到，在 ERG7^{G383N} 的部分，當環化反應走到欲行 C 環擴環之前，會依反馬可尼可夫法則形成 6-6-5 C-14 碳陽離子中間物，此時有一部分受質會在此行終止反應而形成 (13 α H)-isomalabarica-14(26),17E,21-trien-3 β -ol，而當環化反應走到已形成四環結構的 C-20 原脂醇碳陽離子，會開始進行甲基與氫化基的轉移重排，重排至 C-17 碳陽離子中間物時有一部分受質也會在此終止反應形成 Protosta-16,24-dien-3 β -ol。在 ERG7^{G383D} 的部分也有四環產物 Protosta-16,24-dien-3 β -ol 的生成，而同樣也是在 C-14 碳陽離子中間物脫氫的三環產物，但與 ERG7^{G383N} 生成之三環產物不同，一個是受質進入酵素活性區域摺疊成椅型-船型-椅型 (chair-boat-chair) 的 (13 α H)-isomalabarica-14Z,17E,21-trien-3 β -ol，一個是摺疊成椅型-椅型 - 椅型 (chair-chair-chair) 的 (13 α H)-malabarica-14E,17E,21-trien-3 β -ol 《圖3-4》。

藉由 ERG7^{G383X} 生合成產物的分布又更進一步驗證我們的推論，Gly383 可能位於酵素的受質通道上，具有維持活性區域結構的功能；因其為環狀區域的組成胺基酸，所以突變之後可能造成受質和鄰近胺

基酸位置的移動或者是受質摺疊構型的改變，甚至造成酵素失活。而由 Asp和 Asn取代後所產生的三環及四環產物，則說明了雖然與受質間的適當距離不會中斷活性區域中的環化反應，但因為突變後殘基的官能基不同而對環化機制造成影響，使得部分受質在 C-14和 C-17 碳陽離子中間物終止了反應。





《圖3-4》酵母菌ERG7^{G383X}假設產物生成路徑推測圖

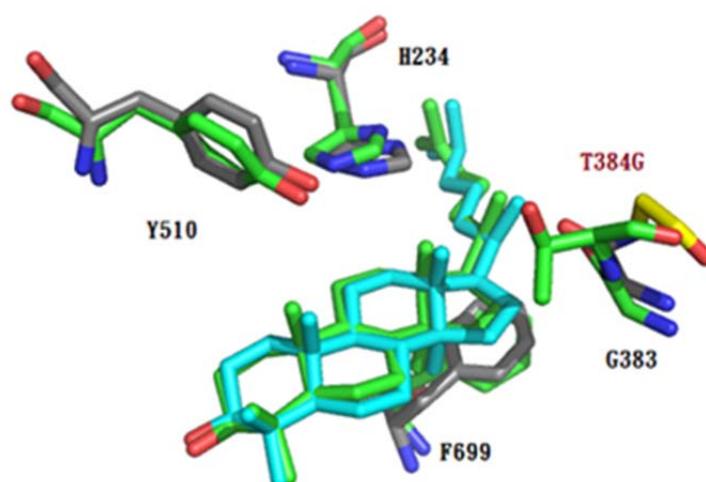
3.1.4.3 ERG7^{T384} 用極性和非極性胺基酸取代的差異

Thr384這個位置在產生四環產物羊毛硬脂醇的 EGR7中 Thr是高度保留的，而在形成環阿屯醇的 CAS中則是高度保留 Tyr，由於這兩個酵素環化機制的唯一差異就是，在環化反應進行到最後一步去質子化步驟時，CAS會催化脫除 C-9上的氫而生成環阿屯醇，而ERG7則催化 C-8上的氫行脫除反應而生成羊毛硬脂醇，加上有文獻報導 CAS^{Y410T}（對應到 ERG7為 Thr384）這個突變株可產生羊毛硬脂醇。因此對於這個位置在酵素中扮演的角色，是不是與脫氫反應有關讓人想更深入探討。

ERG7^{T384X}的產物分布大部分都為四環產物，這與可能會影響酵素環化機制之脫氫反應的觀點不謀而合，但特別的是 19種胺基酸中，大約有一半的胺基酸對 Thr384取代後會有三環產物的產生，接下來將針對這點進行討論。

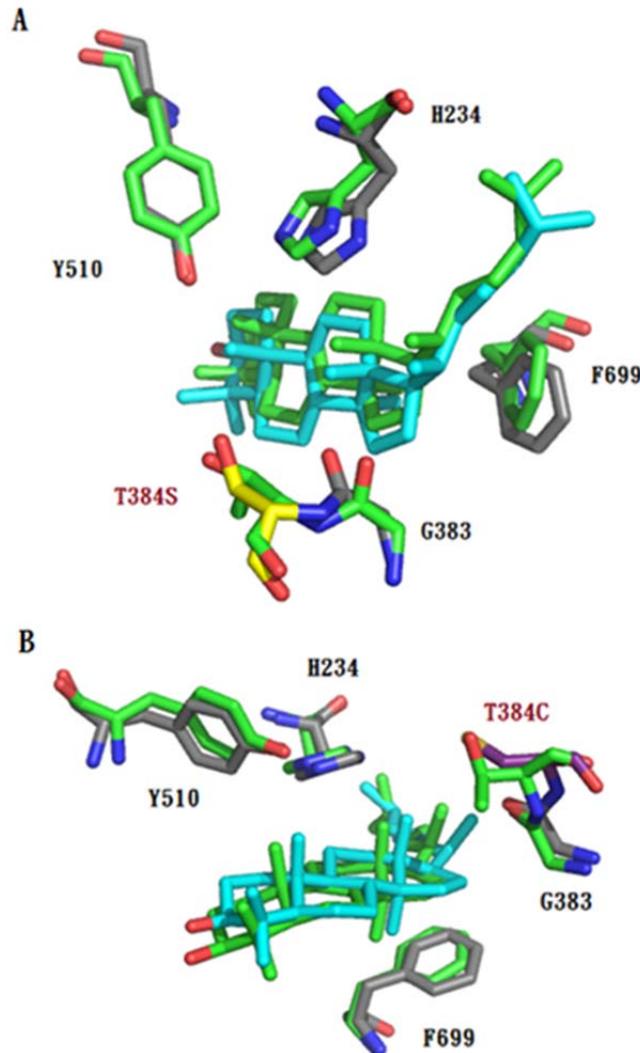
由產物分析表可以發現一個現象，會生成三環產物的取代胺基酸可區分為兩類，極性及非極性胺基酸。首先，以生成產量最多的非極性胺基酸 Gly來做探討《圖3-5》，當 Thr突變成 Gly後，受質和鄰近胺基酸的位置幾乎不變，唯一改變的是 Thr上的 OH基側鏈消失在活性區域中，且隨著非極性胺基酸之側鏈越來越大，三環產物的生成也遞減到零，另外在 ERG7^{T384G}和 ERG7^{T384A}也有在 C-17碳陽離子脫

氫的四環產物生成，因此推測經非極性胺基酸取代後，如果造成活性區域立體結構的空洞，可能會導致受質不穩定而影響環化反應的進行。



《圖3-5》酵母菌ERG7^{T384G}結構模擬圖，野生型ERG7結構以綠色表示

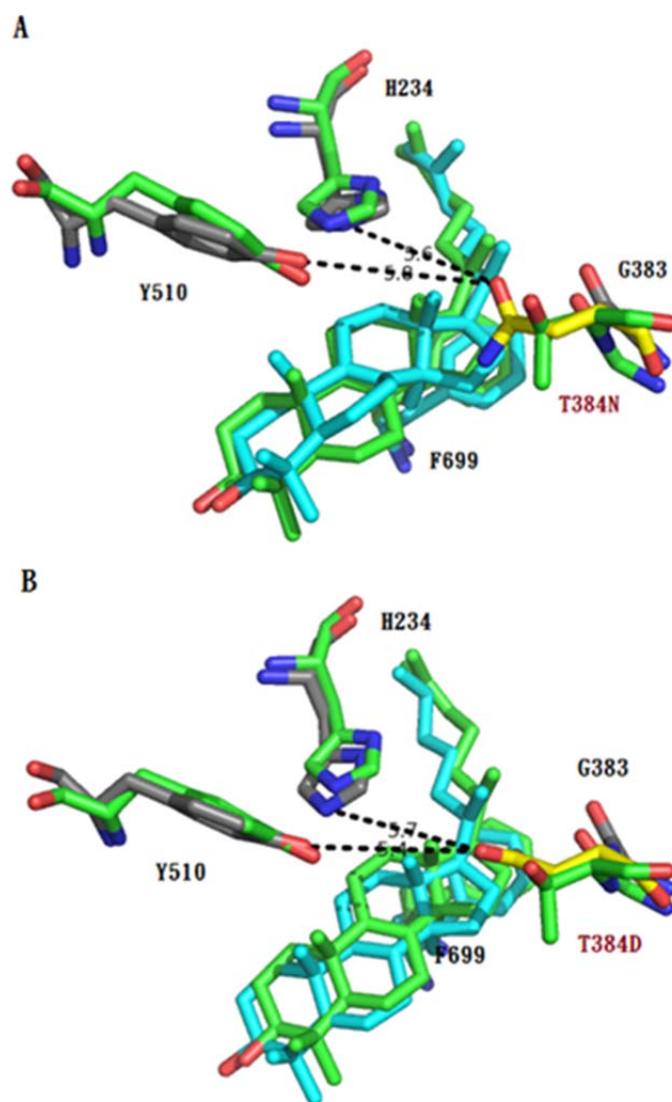
在極性胺基酸的部分，以與 Thr結構類似的 Ser和 Cys來做比較，當 Thr突變成 Ser《圖3-6A》，利用由受質尾端俯瞰的圖可以發現，Gly383也被影響而朝左邊轉動，前面探討 ERG7^{G383}時有提到如果 Gly383改變可能會導致其鄰近胺基酸 His234和 Phe699的位置也跟著變動，從模擬圖也再次驗證此推論；而當 Cys取代 Thr《圖3-6B》，其鄰近胺基酸的位置則幾乎沒有改變。從三環產物分布的結果來看 ERG7^{T384S}較 ERG7^{T384C}多，且因其連帶使 His234和 Phe699的位置移動，所以推測是此原因造成 C-17碳陽離子脫氫之四環產物的生成。



《圖3-6》A. 酵母菌ERG7^{T384S}結構模擬圖，野生型ERG7結構以綠色表示
 B. 酵母菌ERG7^{T384C}結構模擬圖，野生型ERG7結構以綠色表示

另外，也將Asn《圖3-7A》和Asp《圖3-7B》這兩個極性胺基酸提出來討論，從圖中可以看到，當Thr被這兩個胺基酸取代後，由於側鏈較長所以與 His234和 Tyr510的距離縮短了，ERG7^{T384N}與 His234的距離由 7.7 Å縮短為 5.6 Å與 Tyr510的距離由 6.8Å縮短為 5.8Å；ERG7^{T384D}與 His234的距離由 7.7 Å縮短為 5.7 Å、與 Tyr510的距離由 6.8Å縮短為 5.4Å。由於 His234具有穩定 C-14碳陽離子和

C-20原脂醇碳陽離子中間物的功能，而 His234和 Tyr510也被認為是環化機制中脫氫反應的關鍵胺基酸，因此推論 Asn和 Asp的側鏈可能對 His234和 Tyr510造成影響而使環化反應提早終止而生成三環和四環產物。與 ERG7^{T384D}不同的是，ERG7^{T384N}有單環產物的生成，推測應該是因為 Asp為帶負電之胺基酸，所以應該會較 Asn能穩定碳陽離子中間物，這可能也是 ERG7^{T384N}三環產物產量很多的原因。

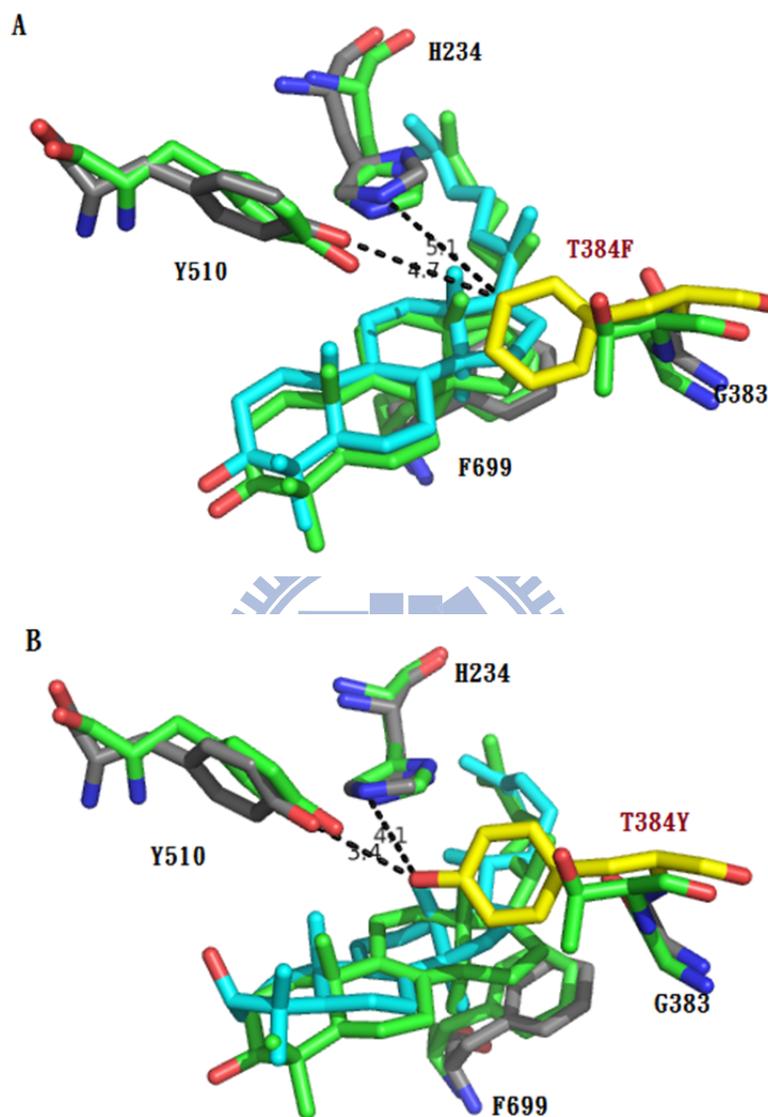


《圖3-7》 A. 酵母菌ERG7^{T384N}結構模擬圖，野生型ERG7結構以綠色表示
B. 酵母菌ERG7^{T384D}結構模擬圖，野生型ERG7結構以綠色表示

藉由 $\text{ERG7}^{\text{T384D}}$ 與 $\text{ERG7}^{\text{T384N}}$ 的討論，或許也能說明為何帶正電的胺基酸 (Lys, Arg, His)，除了因其側鏈很長有立體結構上的障礙，使 Lys 和 Arg 取代 Thr 時造成酵素失活外，由產物分析表可以看到在 $\text{ERG7}^{\text{T384H}}$ 有單環產物和三環產物生成， $\text{ERG7}^{\text{T384K}}$ 也有大量單環產物產生，此結果應該也是因為帶正電之胺基酸影響了碳陽離子中間物使環化反應無法進行。

最後，對芳香族胺基酸 Phe 《圖3-8A》和 Tyr 《圖3-8B》進行討論，從圖中可以發現，當 Thr 突變成 Phe 時其芳香基團縮短了 Thr 與 His234 和 Tyr510 的距離， $\text{ERG7}^{\text{T384F}}$ 與 His234 的距離由 7.7 Å 縮短為 5.1 Å 與 Tyr510 的距離由 6.8 Å 縮短為 4.7 Å。距離的量測告訴我們，Phe 芳香基團的位置較往 Tyr510 偏轉，而 Tyr510 在本實驗室先前的研究中，認為它可以穩定行成 A 環時的碳陽離子中間物，因此推測 $\text{ERG7}^{\text{T384F}}$ 可能會去影響 Tyr510 而導致單環產物 Achilleol A 的生成。而將 Thr 用 Tyr 取代後，因為 Tyr 的芳香環基團比 Phe 多了個 OH 基，造成其與 His234 和 Tyr510 的距離變得非常近， $\text{ERG7}^{\text{T384Y}}$ 與 H234 的距離由 7.7 Å 縮短為 4.1 Å 與 Tyr510 的距離由 6.8 Å 縮短為 3.4 Å。從產物分布圖可以觀察到， $\text{ERG7}^{\text{T384Y}}$ 生成的全都是四環產物，比例占最多的除了羊毛硬脂醇，大部分都是 Parkeol 和 9 β -lanosta-7,24-dien-3 β -ol，因此推測 $\text{ERG7}^{\text{T384Y}}$ 可能藉由其芳香環基團

直接對脫氫反應造成影響，使受質無法在對的位置脫氫而形成其它四環產物。



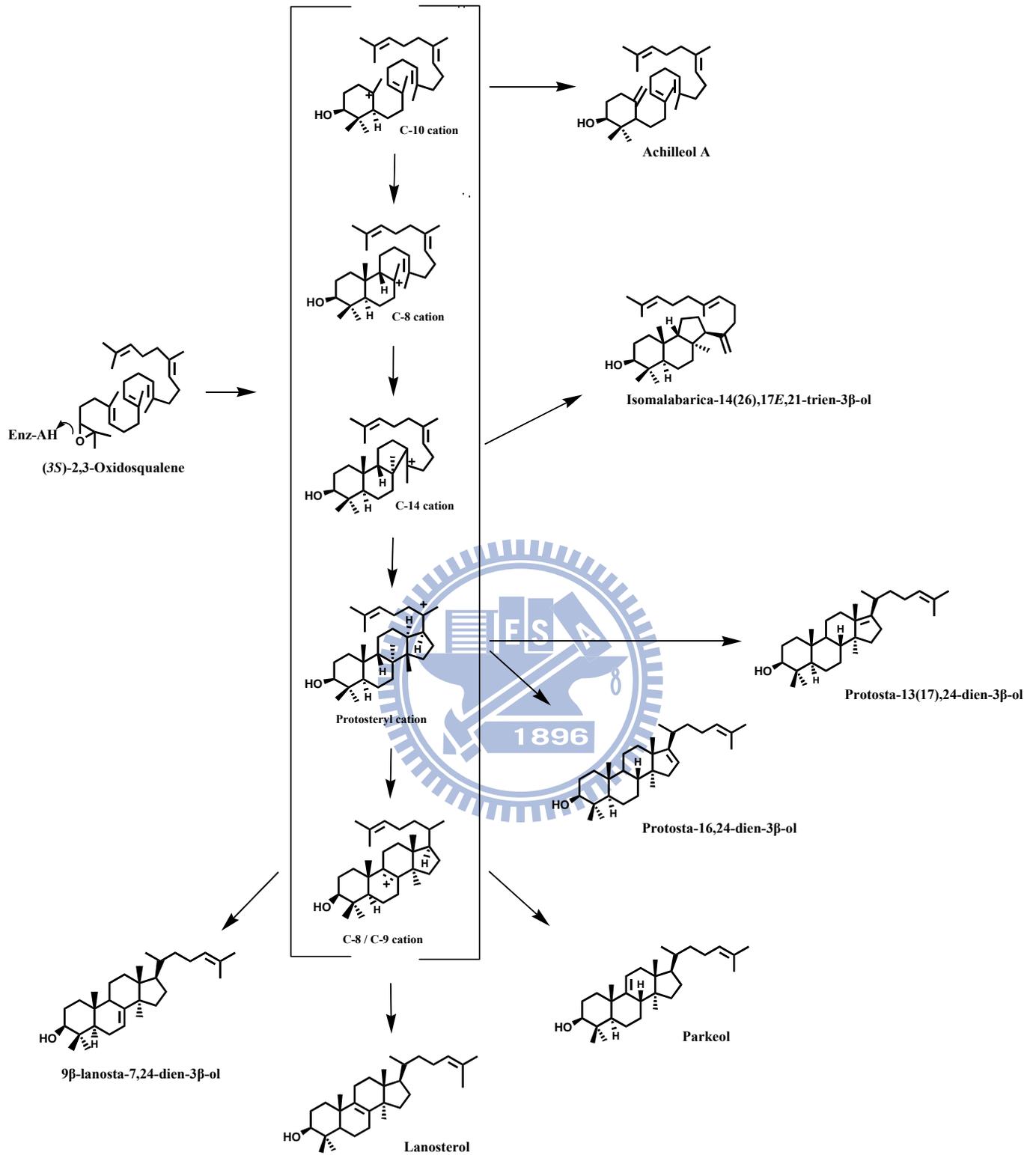
《圖3-8》A. 酵母菌ERG7^{T384F}結構模擬圖，野生型ERG7結構以綠色表示
B. 酵母菌ERG7^{T384Y}結構模擬圖，野生型ERG7結構以綠色表示

3.1.4.4 ERG7^{T384X} 環化過程及生合成途徑推測

從產物分析表可以發現，通常為組成蛋白質二級結構的 Pro，和

側鏈很大很長的 Trp和 Arg，由這些胺基酸取代時都會造成酵素失活，之前也利用模擬圖探討 Thr384突變成各個胺基酸後所造成的影響，綜合以上，當由非極性胺基酸取代時，在 C-14碳陽離子中間物脫氫的三環產物(13 α H)isomalabarica-14(26),17E,21-trien-3 β -ol和在 C-17碳陽離子中間物脫氫的 Protosta-16,24-dien-3 β -ol 與 Protosta-13(17),24-dien-3 β -ol，它們的產量會隨著取代基的增大而遞減到零；因此我們認為 Thr384具有維持活性區域中，環化反應所需之立體空間結構的功能，太小與側鏈太大的胺基酸都會影響環化反應的進行，或使受質不穩定而有在環化過程中脫氫的產物。

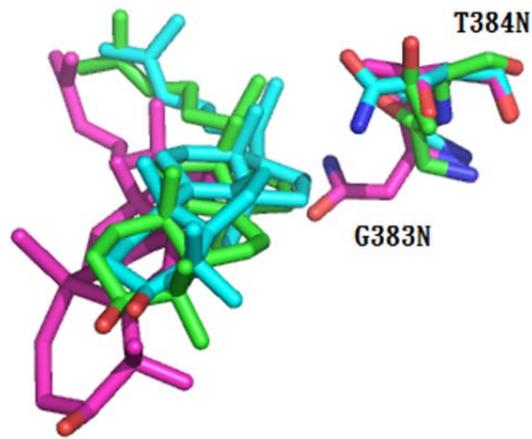
Thr384似乎能穩定環化最後步驟脫氫反應的進行，當由極性或芳香基團胺基酸取代時，一方面除了拉近與鄰近胺基酸的距離，另一方面是這兩種胺基酸都可藉由其側鏈之取代基上帶電荷、電負性或 π -電子效應的特性，直接或間接影響環化反應的進行，以及 His234與 Tyr510的氫鍵拉扯作用，而有中途脫氫的三環與四環產物，和無法在 C8 / C-9 碳陽離子中間物正確位置脫氫的 Parkeol 與 9 β -lanosta-7,24-dien-3 β -ol 《圖3-9》。



《圖3-9》酵母菌ERG7^{T384X} 假設產物生成路徑推測圖

3.1.4.5 ERG7^{G383} 與 ERG7^{T384} 在環化過程所扮演的角色

Gly383和 Thr384雖然相連在一起組成 C-17碳陽離子旁的環狀區域結構，但所具備的功能卻迥然不同，從產物分析圖和突變後的電腦模擬圖《圖3-10》就可以發現，我們將 ERG7^{G383N}和 ERG7^{T384N}與野生型 ERG7放在一起做比較，從圖中可以明顯看到 Gly383Asn位於受質的旁邊，而 Thr384Asn則位於受質上方，不管是對 Gly383還是對 Thr384進行突變都不太會影響到隔壁胺基酸的位置，但 ERG7^{G383N}會造成受質大幅度的變動，ERG7^{T384N}則不會。對於這兩個胺基酸在酵素中所扮演的角色，推論 Gly383可能位於受質通道上，具有專一性，將此位置由別的胺基酸取代，會影響受質進入活性區域或受質在酵素中的位置而導致酵素失活；Thr384可能具有穩定酵素進行環化反應和維持反應進行時活性區域立體結構空間的功能，將此位置由別的胺基酸取代，會影響環化機制的運作，且因其與鄰近胺基酸 His234和 Tyr510位於同一平面（受質上方），所以也會影響脫氫反應的位置。而此實驗結果似乎也應證了，為何 Gly383這個位置是高度保留在 ERG7和 CAS中，而 Thr384則分別由 Thr和 Tyr高度保留在 ERG7和 CAS中。

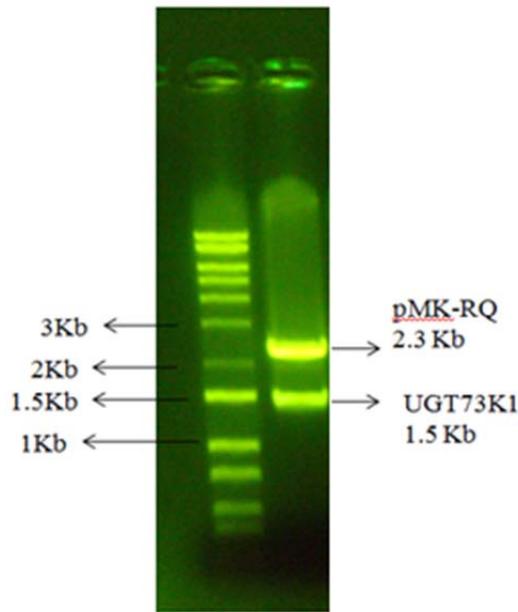


《圖3-10》 $ERG7^{T384N}$ (藍色)、 $ERG7^{G383N}$ (紅色) 與野生型 $ERG7$ (綠色) 之比較模擬結構圖

3.2 轉糖酵素 UGT73K1 之取得

3.2.1 對 UGT73K1 合成序列之洋菜膠電泳檢驗

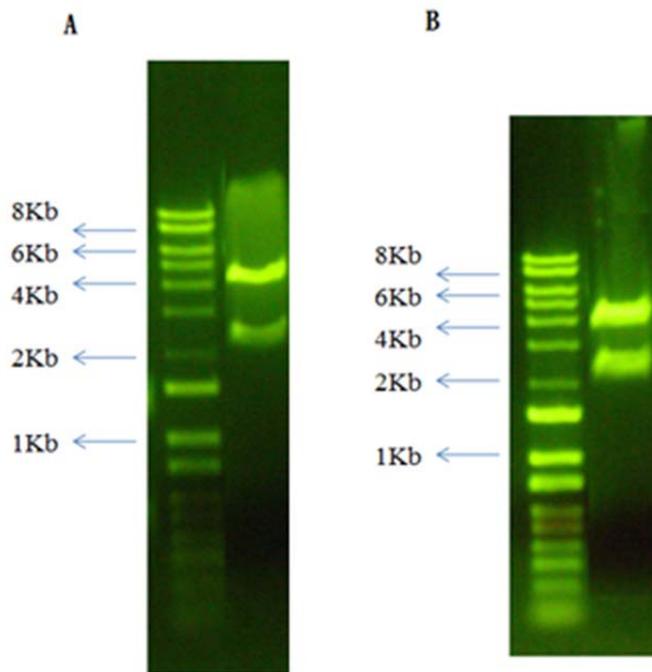
取出少量由 Mr.Gene 公司合成完之質體 DNA -YCCUGT73K1_pMK-RQ，先利用勝任細胞 XL1-blue 進行放大，熱休克 (heat shock) 後在 37°C 下培養約 16 小時，於 LB 培養基中挑取兩個單一菌落分別培養於 3 ml 含 Kanamycin 的 LB 試管，接著將放大抽取所得的質體 DNA，與限制酶 *Bam*HI 和 *Not*I 反應，反應後以洋菜膠電泳檢驗，如果所設計的序列及放大的過程沒有問題，則會切出基因大小為 1.5Kb 的 UGT73K1 和 2.3Kb 的載體 pMK-RQ《圖 3-11》。



《圖3-11》合成之質體DNA- YCCUGT73K1_pMK-RQ電泳檢驗圖

3.2.2 表現質體之構築與確認

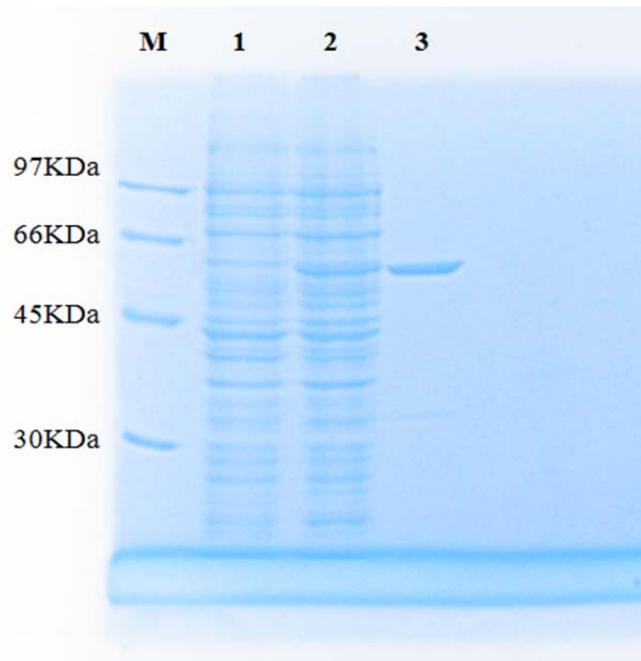
將質體 DNA- YCCUGT73K1_pMK-RQ 和載體 pET28a (+) 都先以限制酶 *NotI* 及 *BamHI* 切出所需要連接的片段，接著利用 T4 DNA 接合酶將基因 UGT73K1 與載體 pET28a (+) 進行接合作用，所得之重組質體為 pET28a (+) UGT73K1。一樣利用勝任細胞 XL1-blue 對重組質體進行放大，並挑取兩個單一菌落分別培養於 3 ml 含 Kanamycin 的 LB 試管，接著將放大抽取所得的重組質體，以限制酶 *AlwNI* (圖3-12A) 和 *PvuI* (圖3-12B) 作確認，兩者都會將 pET28a (+) UGT73K1 切成 4.4Kb 及 2.5Kb 兩個片段。酵素鑑定無誤後，即送交廠商進行重組質體之定序。



《圖3-12》重組質體DNA- pET28a (+) / UGT73K1電泳檢驗圖

3.2.3 重組基因在大腸桿菌之表現

確認定序結果無誤，將 pET28a (+) UGT73K1 重組質體轉形至 BL21 (DE3) 勝任細胞後，培養於 3 ml 含 Kanamycin 的 LB 試管並置於 37°C 隔夜培養。之後再放大於以高壓滅菌過的 500 mL LB 培養液，於 37°C 振盪培養至菌液濃度達吸光值(波長600 nm)為 0.7，加入 IPTG 進行蛋白質誘發，並置於 20°C 進行隔夜振盪培養，接者進行破菌及利用表現之載體接有 His·Tag 的特性，以鎳離子層析管柱來分離純化，純化後的蛋白質大小為 52KDa 《圖3-13》。



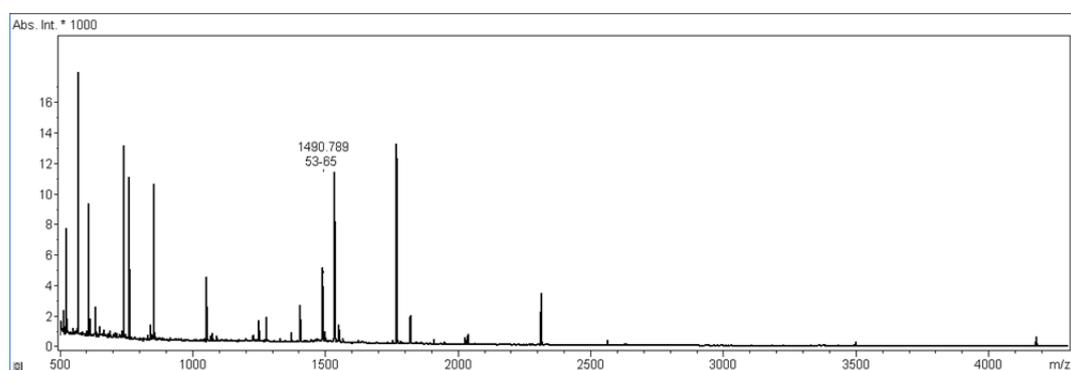
《圖3-13》 pET28a (+) UGT73K1在大腸桿菌BL21 (DE3) 的表現及純化結果

1: 載體 pET28a(+)表現後之上清液; 2: 重組質體pET28a(+) UGT73K1表現後之上清液; 3: 重組質體pET28a (+) UGT73K1表現後經鎳離子層析管柱純化後之蛋白質

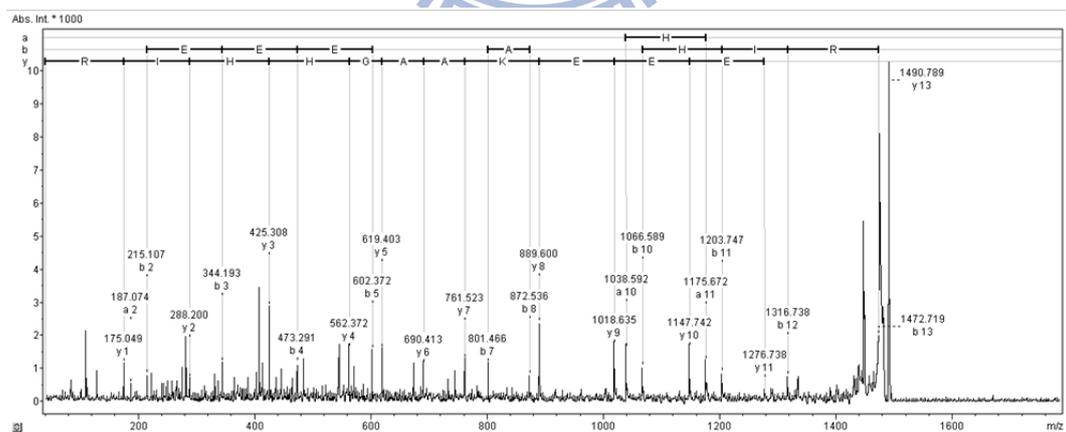
3.2.4 利用基質輔助雷射脫附質譜儀對UGT73K1作確認

為了進一步證明所純化出的蛋白質就是轉糖酵素 UGT73K1，我們使用基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜儀 (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometer, MALDI-TOF MS) 作確認。先將 SDS-PAGE 中已純化出大小為 52KDa 的 band 挖一小塊起來，接著利用胰蛋白酶 (trypsin) 做切除的動作，切位為 lysine (Lys, K) 以及 arginine (Arg, R) 的 C 端，待酵素作用完成，這些反應後的胜肽片段就可被放入儀器分析，結果如《圖 3-14》，將此質譜與資料庫做搜尋比對，另外也選了單一 peak (m/z 1490.789) 利用

串連式質譜 (tandem mass) 進行二次圖譜分析，儀器中使用撞擊引發解離作用 (collision-induced dissociation, CID)，最後由 TOF 偵測碎片質量來分析胜肽的胺基酸序列而得到 MS/MS 圖譜《圖 3-15》，藉由以上圖譜分析確認純化出的蛋白質為轉糖酵素 UGT73K1 無誤。



《圖3-14》轉糖酵素UGT73K1之MALDI-TOF MS圖

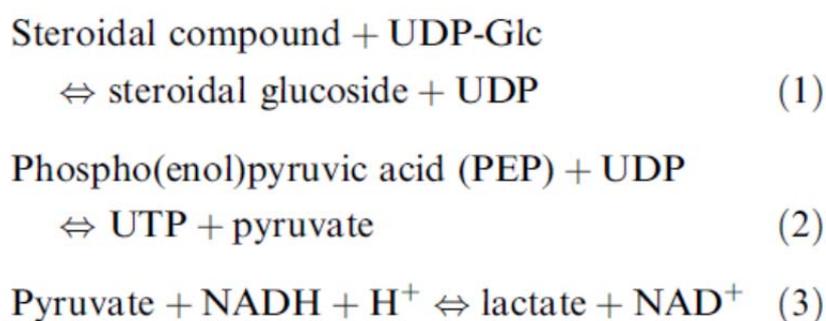


《圖3-15》利用CID對胜肽片段 (m/z 1490.789) 進行碎裂所得到之MS/MS圖譜

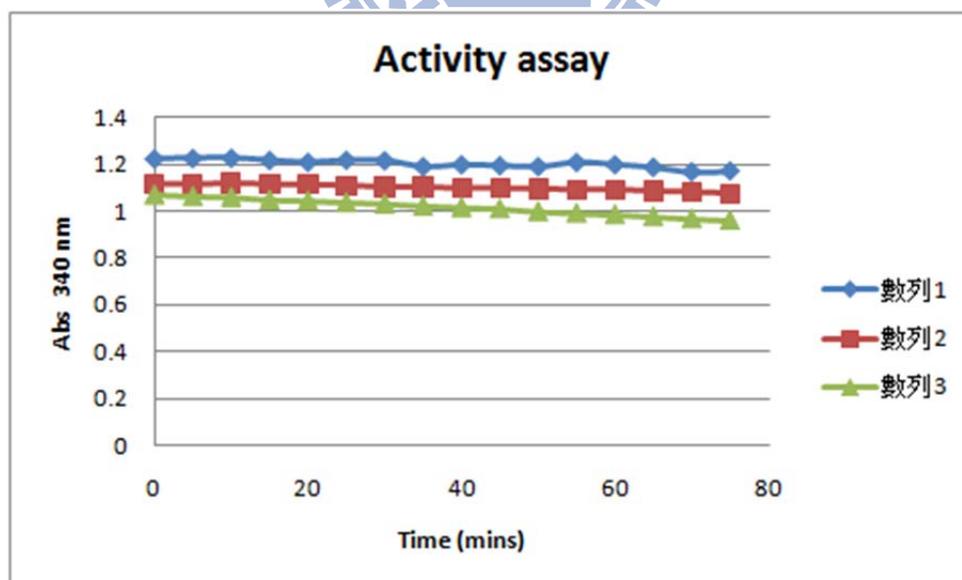
3.2.5 利用酵素耦合對UGT73K1進行活性測試

確定純化出的蛋白質為轉醣酵素-UGT73K1後，利用除鹽層析管柱 (desalting column) 去除掉蛋白質緩衝液中的咪唑 (imidazole) 及小分子。在將 OSC突變產物作為此轉醣酵素的受質前，必須先確認其活性，因此我們把 UGT73K1在蒺藜苜蓿生成皂苷所使用的受質之一 HederagenIn作為活性測試的受質，並利用酵素耦合 (coupled enzyme) 的方式進行⁶⁰《圖3-16》。硫酸鎂 2.5 mM、氯化鉀 10 mM、NADH (Nicotinamide adenine dinucleotide) 0.12 mM、PEP (phosphoenolpyruvate) 2.5 mM、UDP-glucose 2 mg、pyruvate kinase 25 units、lactate dehydrogenase 4 units、受質 HederagenIn 40 µg、UGT73K1轉醣酵素 13 µg 在總體積為 1 mL 的50 mM Tris-HCl (pH 8) 緩衝液中，於 30°C 下反應約 1 個小時《圖3-17》。在進行完整反應前，已確認圖3-15中的反應式(3)及反應式(2)、(3)耦合在 340 nm 波長下，吸收值可隨時間增加而逐漸下降。圖3-16中數列1 為上述所有反應物，數列2 為上述所有反應物但未加受質HederagenIn，數列3 為上述所有反應物但未加轉醣酵素 UGT73K1，反應時間都為 80分鐘。但由圖中可發現，此三個反應在 340 nm波長下的吸收值都沒有變化，我們認為此反應環境可能不適合 UGT73K1，於是將 50 mM Tris-HCl 緩衝液的 pH 值換成 9，但 340 nm 波長下吸收值依

舊沒下降；而將50 mM Tris-HCl 緩衝液的 pH 值換成 7，反應式(2)、(3)耦合的效率開始變得很差，因此反應式(1)、(2)、(3)耦合時的完整反應 340 nm 波長下吸收值也沒有變化。對於此轉醣酵素 UGT73K1的酵素耦合活性測試，可能在反應條件上必需再多方嘗試，或者找尋其他一樣可快速知道酵素活性的測試方式。



《圖3-16》酵素耦合反應式⁶⁰



《圖3-17》UGT73K1酵素耦合活性測試反應結果

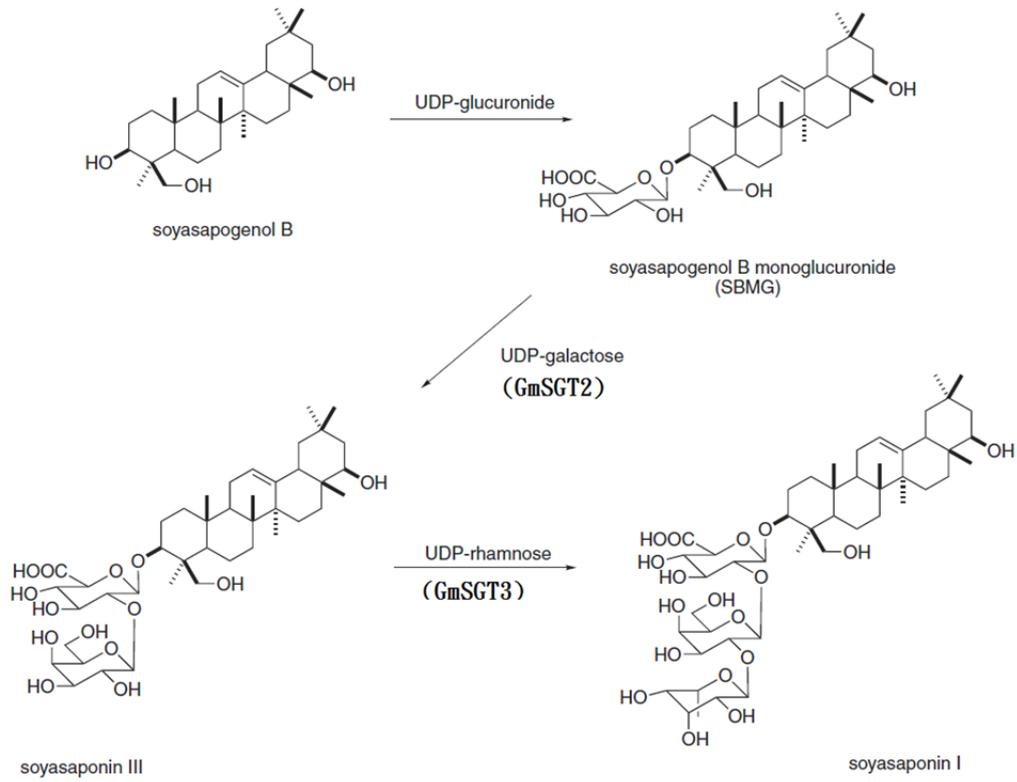
數列1：所有反應物、數列2：所有反應物但未加受質Hederagenln、
數列3：所有反應物但未加轉醣酵素UGT73K1

3.2.6 皂苷轉醣酵素胺基酸序列比對

皂苷這個由高等植物所生成的二級代謝產物具有非常豐富的多樣性，加上目前已被定義的轉醣酵素只有 5 種，所以對於皂苷完整的生合成途徑還未有充分的瞭解及認識。由於還沒有皂苷轉醣酵素的相關蛋白質結構資訊，因此對已被定義的 5 種轉醣酵素，進行序列比對藉以觀察其之間的相似性《圖3-18》。UGT73K1及 UGT71G1是從 *Medicago truncatula* 分離出來；UGT74M1是從 *Saponaria vaccaria* 分離出來；GmSGT2及 GmSGT3則是從 *Glycine max* 分離出來。

UGT73K1	-----MGTESKPLKIYMLPFFAQGHLIPLVNLARLVASKNQ--HVTIITTPSNAQLFD	51
GmSGT2	-----MEKKKGELKSIPLPFLSTSHIPLVDMARLFFALHDV--DVTIITTAHNATVFQ	51
UGT71G1	-----MSMSDINKNSELIFIPAPGIGHLASALEFAKLLTNHDKNLYITVFCIKFPGMPFA	55
UGT74M1	-----MSNNENNATQVI VLPYHGQGHMNTMVQFAKRLAWKGV--HVTIATTFN--TIQQ	50
GmSGT3	MDSVALNGKSNDKPLHVAMLPWLAMGHIYPYFEVAKILAQKGH--FVTFINSPKNIDRMP	58
	. . . : * . . . * : . . . : . . . : *	
UGT73K1	KTIEEEKAAGHHIRVHI IKFPSAQLGLPTGVENLFAASDNQTAGK IHMAAHFVKADIEEF	111
GmSGT2	KSIDLASRGRPIRTHVNVFPAAQVGLPVGIEAFNVDTPREMTPRIYMGLSLLQQVFEKL	111
UGT71G1	DSYIKSVLASQPQ-IQLIDLPEVEP----PPQELLSPEFYILTFLESLEIPHKATIKTI	110
UGT74M1	MKLNISYNSITLEPIYDDTDDSTLHIKDRMARFEAEASNLTRVLEAKKQQALNKKCL	110
GmSGT3	KTP----KHLEPFIKLVKLPLKIEHLPEGAESTMDIPSKKNCFLKAYEGLQYAVSKL	113
 :	
UGT73K1	MKENPPDVFISDIIFTWSESTAKNLQIPRLVFNPI SIFDVCMIQ A---IQSHPESFVS--	166
GmSGT2	FHDLQPDFIVTDMFHPWSVDAAAKLGIPRIMFHGASYLARSAAHS---VEQYAPHLEAKF	168
UGT71G1	LSN-KVVGLVLDFFCVSMIDVGNFEGIPSYLFLTSNVGFLSLMLS---LKNRQIEEVFDD	166
UGT74M1	LVYHGSLNWALVVAHQNVAGAAFFTAASASFACYYYYLHLESQKGVDLEELPSILPPPK	170
GmSGT3	LKTSNPDWLYDFAAAWV IPIAKSYNIPCAHYNITPAFNKVFFDPP-KDKMKDYSLASIC	172
	: : :	

從胺基酸序列比對結果可以發現，此5種轉醣酵素的相似性大約2~3成左右。而造成此結果的原因可能有以下幾個因素：1. 受質醣基的不同，先前有提到，皂苷配基上的醣鏈是由不同的轉醣酵素將醣基一個一個接上去，而不是預先形成醣鏈後才經由酵素作用到皂苷配基上，像 GmSGT2為 UDP-galactose: SBMG-galactosyltransferase、GmSGT3為UDP-rhamnose: soyasaponin III-rhamnosyltransferase⁵⁷《圖3-19》，而 UGT73K1, UGT71G1和UGT74M1則都為UDP-glucose: triterpene-glucosyltransferases。2. 皂苷配基和專一性的不同，像UGT71G1對於 Quercetin, Genistein, Biochanin A和Hederagenin都有活性；而 UGT73K1則對於 Soyasapogenol B和 Hederagenin有活性⁵⁹。3. 醣基接上皂苷配基的位置不同，像 UGT74M1為 triterpene carboxylic acid glucosyltransferase，會將醣基接在 C-28的 COOH上⁶¹，而 UGT73K1和 UGT71G1則是有可能將醣基接在 C-3的 OH、C-22的 OH或 C-28的 OH⁵⁹。雖然此 5種轉醣酵素的機能都是將單醣轉移至五環的皂苷配基上，但可能由於以上因素使得其序列比對僅僅只有2~3成的相似性，而此結果似乎也能與為何皂苷具有如此豐富多樣性的特點相呼應。



《圖3-19》轉醣酵素 GmSGT2 及 GmSGT3 的作用機制⁵⁷



第四章 結論與未來展望

在整個論文研究中，主要分為兩部分，第一部分為利用定點飽和突變將酵母菌 $ERG7^{G383}$ 和 $ERG7^{T384}$ 突變成其他 19 種胺基酸，藉由突變產物的分析及分子模擬結構圖，對酵素結構、活性區胺基酸所扮演的角色，進行結構、功能及機制上的探討；第二部分為皂苷轉糖酵素的取得，利用由蒺藜苜蓿 (*Medicago truncatula*) 的根部所分離的轉糖酵素-UGT73K1，進行 DNA 序列的合成、重組質體的建構，和蛋白質的表現與純化。

4.1 酵母菌 $ERG7^{G383}$ 和 $ERG7^{T384}$ 功能性分析

(1) 在酵母菌 $ERG7^{G383X}$ 的功能性篩選的結果中，除了比較小的胺基酸 (Ala, Ser, Pro) 及 Asp 和 Asn 外，其餘所有的突變株都會導致酵素失去活性。

(2) 當 Gly383 突變成 Asp 和 Asn 時，其胺基酸側鏈伸向了活性區域中，造成 His234 和 Phe699 的位置有明顯改變且導致受質的偏轉幅度很大。因其突變後與 C-14 及 C-17 碳陽離子的距離都跟野生型 $ERG7$ 差不多，或許對於 Gly383 這個位置，胺基酸與受質間的適當距離不會中斷活性區域中的環化反應，但因為突變後殘基所帶的官能

基不同對環化機制造成影響而有三環和四環產物的生成。

(3) 在 $\text{ERG7}^{\text{G383N}}$ 的部分，當環化反應走依反馬可尼可夫法則形成 6-6-5 C-14 碳陽離子中間物，此時有一部分受質會在此行終止反應而形成 $(13\alpha\text{H})\text{isomalabarica-14}(26),17\text{E},21\text{-trien-3}\beta\text{-ol}$ ，而當環化反應走到 C-20 原脂醇碳陽離子，開始進行甲基與氫化基的轉移，重排至 C-17 碳陽離子中間物時有一部分受質也會在此終止反應形成 $\text{Protosta-16,24-dien-3}\beta\text{-ol}$ 。

(4) 在 $\text{ERG7}^{\text{G383D}}$ 的部分也有四環產物 $\text{Protosta-16,24-dien-3}\beta\text{-ol}$ 的生成，和同樣在 C-14 碳陽離子中間物脫氫的三環產物，但與 $\text{ERG7}^{\text{G383N}}$ 生成之三環產物不同，一個是受質進入酵素活性區域摺疊成椅型-船型-椅型的 $(13\alpha\text{H})\text{-isomalabarica-14Z},17\text{E},21\text{-trien-3}\beta\text{-ol}$ ，一個是摺疊成椅型-椅型-椅型的 $(13\alpha\text{H})\text{-malabarica-14E},17\text{E},21\text{-trien-3}\beta\text{-ol}$ 。

(5) Gly383 可能位於酵素的受質通道上，具有維持活性區域結構的功能；因其為環狀區域的組成胺基酸，所以突變之後可能造成受質和鄰近胺基酸位置的移動或者是受質摺疊構型的改變，而影響環化機制甚至造成酵素失活。

(6) 在酵母菌 $ERG7^{GT384X}$ 的功能性篩選的結果中四個會使酵素失去活性的突變株中，Lys取代會產生大量的單環產物和少許四環產物，至於其他致死的三個胺基酸取代 (Trp, Arg 和Pro)，則完全沒有 m/z 值為 426 的產物。在其它的胺基酸取代中除了羊毛硬脂醇還會有許多三環和四環產物的生成。

(7) 當 Thr384由非極性胺基酸取代時，在 C-14碳陽離子中間物脫氫的三環產物 (13 α H)isomalabarica-14(26),17E,21-trien-3 β -ol 和在 C-17 碳陽離子中間物脫氫的 Protosta-16,24-dien-3 β -ol 與 Protosta-13(17),24-dien-3 β -ol，它們的產量會隨著取代基的增大而遞減到零；因此 Thr384可能具有維持環化反應進行時活性區域所需之立體空間結構的功能，太小與側鏈太大的胺基酸都會對其造成影響，或使受質不穩定而有在環化過程中脫氫的產物。

(8) Ser和 Cys的取代在 384位置與Thr384結構類似，但從三環產物分布的結果來看 $ERG7^{T384S}$ 卻較 $ERG7^{T384C}$ 多，當 Thr384突變成 Ser 時，Gly383也被影響而朝左邊轉動，而 Gly383改變可能會影響其鄰近胺基酸 His234和 Phe699的位置，且推測此原因可能也造成 C-17 碳陽離子脫氫之四環產物的生成。

(9) 當 Thr384被 Asp和 Asn這兩個胺基酸取代後，由於側鏈較長

所以與 His234和 Tyr510的距離縮短了，因此 Asn和 Asp的側鏈可能對 His234和 Tyr510造成影響而使環化反應提早終止而生成三環和四環產物。與 ERG7^{T384D}的差異是，ERG7^{T384N}有單環產物的生成，推測應該是因為 Asp為帶負電之胺基酸，似乎較 Asn能穩定碳陽離子中間物，這可能也是 ERG7^{T384N}三環產物產量很多的原因。

(10) ERG7^{T384F}與 His234的距離由 7.7 Å縮短為 5.1 Å與 Tyr510的距離由 6.8Å縮短為 4.7Å。距離的量測顯示，Phe芳香基團的位置較往 Tyr510偏轉，因此推測 ERG7^{T384F}可能會去影響 Tyr510而導致單環產物 Achilleol A的生成。

(11) Tyr比 Phe的胺基酸側鏈多了個OH基，當 384位置置換成 Tyr後，將造成其與 His234和 Tyr510的距離變得非常近，其與 H234的距離由 7.7 Å縮短為 4.1 Å與 Tyr510的距離由 6.8Å縮短為 3.4Å。且 ERG7^{T384Y}生成的全都是四環產物，比例占最多的除了羊毛硬脂醇，大部分都是 Parkeol和 9β-lanosta-7,24-dien-3β-ol，因此推測 ERG7^{T384Y}可能藉由其芳香環基團直接對脫氫反應造成影響，使受質無法在適當的位置脫氫而導致形成其它四環產物。

(12) Thr384似乎能穩定環化最後步驟脫氫反應的進行，當由極性或芳香基團胺基酸取代時，除了拉近與鄰近胺基酸的距離，其可能藉由

側鏈之取代基上帶電荷、電負性或 π -電子效應的特性，直接或間接影響環化反應的進行，或 His234與 Tyr510的氫鍵拉扯作用，而有中途脫氫的三環與四環產物，和無法在C8 / C-9 碳陽離子中間物正確位置脫氫的 Parkeol與 9β -lanosta-7,24-dien-3 β -o。

4.2 轉醣酵素UGT73K1的取得

皂苷具有溶血、抗黴菌、抗癌，以及作為疫苗佐劑等生物活性，且許多文獻報導也指出其生物活性的關鍵，推測與皂苷配基三萜類化合物上之 C3-OH的醣基有關，而醣基化是由轉醣酵素所作用得來。我們選擇由蒺藜苜蓿 (*Medicago truncatula*) 的根部所發現的轉醣酵素-UGT73K1，進行 DNA序列的合成、重組質體的建構，利用大腸桿菌 BL21 (DE3) 進行蛋白質的表現，再經由鎳離子層析管柱來分離純化，成功得到蛋白質大小為 52KDa的 UGT73K1。而在酵素活性測試的部分，雖然目前並沒有很完整的結果，但對於蛋白質的純度及特性每一次每一次都有更深入的瞭解，此外在嘗試不同酵素耦合反應條件的同時，也會積極尋找其他一樣或者更快速的測試方法。

因為本實驗室利用定點飽和突變探討酵母菌氧化鯊烯環化酵素的環化機制已研究多年，期間透過突變的策略得到多種不完全的環化或脫氫在不同於羊毛硬脂醇位置的產物，希望對於突變後所得到的許

多四環產物能有更多應用性及發展，因此如果能將這些突變產物作為此轉醣酵素的受質，在 C3-OH接上醣基，並對其進行生物活性的相關測試，相信對於氧化鯊烯環化酵素的研究能有更進一步的延伸。另外也期望透過醣基化修飾反應的產物能應用於生物製藥領域，對於科學及社會盡一份心力和貢獻。



第五章 參考文獻

- (1) Xu, R.; Fazio, G. C.; Matsuda, S. P. *Phytochemistry* **2004**, *65*, 261.
- (2) Abe, I.; Rohmer, M.; Prestwich, G. D. *Chemical Reviews* **1993**, *93*, 2189.
- (3) Allayee, H.; Laffitte, B. A.; Lusic, A. J. *Science* **2000**, *290*, 1709.
- (4) Vance, D. E.; Van den Bosch, H. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* **2000**, *1529*, 1.
- (5) Simons, K.; Toomre, D. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2000**, *1*, 31.
- (6) Simons, K.; Eehalt, R. *The Journal of Clinical Investigation* **2002**, *110*, 597.
- (7) Schulz-Gasch, T.; Stahl, M. *Journal of Computational Chemistry* **2003**, *24*, 741.
- (8) Abe, I.; Zheng, Y. F.; Prestwich, G. D. *Biochemistry* **1998**, *37*, 5779.
- (9) Corey, E. J.; Virgil, S. C. *Journal of the American Chemical Society* **1991**, *113*, 4025.
- (10) Barton, P. G.; Gunstone, F. D. *Journal of Biological Chemistry* **1975**, *250*, 4470.
- (11) Zoltewicz, J. A.; Maier, N. M.; Fabian, W. M. F. *The Journal of Organic Chemistry* **1998**, *63*, 4985.
- (12) Miklis, P. C.; Ditchfield, R.; Spencer, T. A. *Journal of the American Chemical Society* **1998**, *120*, 10482.
- (13) Gallivan, J. P.; Dougherty, D. A. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1999**, *96*, 9459.
- (14) Thoma, R.; Schulz-Gasch, T.; D'Arcy, B.; Benz, J.; Aebi, J.; Dehmlow, H.; Hennig, M.; Stihle, M.; Ruf, A. *Nature* **2004**, *432*, 118.
- (15) Corey, E. J.; Cheng, H.; Baker, C. H.; Matsuda, S. P. T.; Li, D.; Song, X. *Journal of the American Chemical Society* **1997**, *119*, 1277.
- (16) van Tamelen, E. E.; Willet, J.; Schwartz, M.; Nadeau, R. *Journal of the American Chemical Society* **1966**, *88*, 5937.
- (17) Segura, M. J. R.; Jackson, B. E.; Matsuda, S. P. T. *Natural Product Reports* **2003**, *20*, 304.
- (18) Wendt, K. U. *Angewandte Chemie International Edition* **2005**, *44*, 3966.
- (19) Corey, E. J.; Staas, D. D. *Journal of the American Chemical Society* **1998**, *120*, 3526.

- (20) Hess, B. A. *Journal of the American Chemical Society* **2002**, *124*, 10286.
- (21) Hess, B. A. *Organic Letters* **2003**, *5*, 165.
- (22) Jenson, C.; Jorgensen, W. L. *Journal of the American Chemical Society* **1997**, *119*, 10846.
- (23) Joubert, B. M.; Hua, L.; Matsuda, S. P. T. *Organic Letters* **2000**, *2*, 339.
- (24) Wu, T.-K.; Li, W.-H.; Chang, C.-H.; Wen, H.-Y.; Liu, Y.-T.; Chang, Y.-C. *European Journal of Organic Chemistry* **2009**, *2009*, 5731.
- (25) Wu, T.-K.; Liu, Y.-T.; Chiu, F.-H.; Chang, C.-H. *Organic Letters* **2006**, *8*, 4691.
- (26) Corey, E. J.; Virgil, S. C.; Cheng, H.; Baker, C. H.; Matsuda, S. P. T.; Singh, V.; Sarshar, S. *Journal of the American Chemical Society* **1995**, *117*, 11819.
- (27) Abe, I. *Natural Product Reports* **2007**, *24*, 1311.
- (28) Wu, T.-K.; Liu, Y.-T.; Chang, C.-H.; Yu, M.-T.; Wang, H.-J. *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128*, 6414.
- (29) Wu, T.-K.; Chang, C.-H.; Wen, H.-Y.; Liu, Y.-T.; Li, W.-H.; Wang, T.-T.; Shie, W.-S. *Organic Letters* **2010**, *12*, 500.
- (30) Wu, T.-K.; Wen, H.-Y.; Chang, C.-H.; Liu, Y.-T. *Organic Letters* **2008**, *10*, 2529.
- (31) Johnson, W. S.; Lindell, S. D.; Steele, J. *Journal of the American Chemical Society* **1987**, *109*, 5852.
- (32) Johnson, W. S.; Telfer, S. J.; Cheng, S.; Schubert, U. *Journal of the American Chemical Society* **1987**, *109*, 2517.
- (33) Griffin, R. J.; Stevens, M. F. *Structural studies on bio-active compounds. Part 21. Acid-promoted debenzylations in antitumour 2,4-diamino-5-[4-(N-alkylbenzylamino)-3-nitrophenyl]-6-ethylpyrimidines*, 1992; Vol. 7.
- (34) Wu, T.-K.; Liu, Y.-T.; Chang, C.-H. *ChemBioChem* **2005**, *6*, 1177.
- (35) Wu, T.-K.; Chang, C.-H. *ChemBioChem* **2004**, *5*, 1712.
- (36) Lodeiro, S.; Wilson, W. K.; Shan, H.; Matsuda, S. P. T. *Organic Letters* **2006**, *8*, 439.
- (37) Wu, T.-K.; Yu, M.-T.; Liu, Y.-T.; Chang, C.-H.; Wang, H.-J.; Diao, E. W.-G. *Organic Letters* **2006**, *8*, 1319.
- (38) Herrera, J. B. R.; Wilson, W. K.; Matsuda, S. P. T. *Journal of the American Chemical Society* **2000**, *122*, 6765.
- (39) Lodeiro, S.; Segura, M. J. R.; Stahl, M.; Schulz-Gasch, T.; Matsuda,

- S. P. T. *ChemBioChem* **2004**, *5*, 1581.
- (40)Lodeiro, S.; Schulz-Gasch, T.; Matsuda, S. P. T. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*, 14132.
- (41)Hart, E. A.; Hua, L.; Darr, L. B.; Wilson, W. K.; Pang, J.; Matsuda, S. P. T. *Journal of the American Chemical Society* **1999**, *121*, 9887.
- (42)Kushiro, T.; Shibuya, M.; Masuda, K.; Ebizuka, Y. *Journal of the American Chemical Society* **2000**, *122*, 6816.
- (43)Sparg, S. G.; Light, M. E.; van Staden, J. *Journal of Ethnopharmacology* **2004**, *94*, 219.
- (44)Yendo, A.; de Costa, F.; Gosmann, G.; Fett-Neto, A. *Molecular Biotechnology* **2010**, *46*, 94.
- (45)Haralampidis, K.; Trojanowska, M.; Osbourn, A. In *History and Trends in Bioprocessing and Biotransformation*; Dutta, N., Hammar, F., Haralampidis, K., Karanth, N., König, A., Krishna, S., Kunze, G., Nagy, E., Orlich, B., Osbourn, A., Raghavarao, K., Riedel, K., Sahoo, G., Schomäcker, R., Srinivas, N., Trojanowska, M., Eds.; Springer Berlin / Heidelberg: 2002; Vol. 75, p 31.
- (46)Oda, K.; Matsuda, H.; Murakami, T.; Katayama, S.; Ohgitani, T.; Yoshikawa, M. *Biological Chemistry* **2000**, *381*, 67.
- (47)Lásztity, R.; Hidvégi, M.; Bata, A. *Food Reviews International* **1998**, *14*, 371.
- (48)Hiai, S.; Oura, H.; Nakajima, T. *Planta Med* **1976**, *29*, 116.
- (49)Francis, G.; Kerem, Z.; Makkar, H. P.; Becker, K. *Br J Nutr* **2002**, *88*, 587.
- (50)Burbano, C.; Muzquiz, M.; Ayet, G.; Cuadrado, C.; Pedrosa, M. M. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **1999**, *79*, 1468.
- (51)Sen, S.; Makkar, H. P. S.; Becker, K. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1998**, *46*, 131.
- (52)Yan, M.-C.; Liu, Y.; Chen, H.; Ke, Y.; Xu, Q.-C.; Cheng, M.-S. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2006**, *16*, 4200.
- (53)Fleck, J. D.; Kauffmann, C.; Spilki, F.; Lencina, C. L.; Roehe, P. M.; Gosmann, G. *Vaccine* **2006**, *24*, 7129.
- (54)Vincken, J.-P.; Heng, L.; de Groot, A.; Gruppen, H. *Phytochemistry* **2007**, *68*, 275.
- (55)Shibuya, M.; Hoshino, M.; Katsube, Y.; Hayashi, H.; Kushiro, T.; Ebizuka, Y. *FEBS Journal* **2006**, *273*, 948.
- (56)Choi, D.-W.; Jung, J.; Ha, Y. I.; Park, H.-W.; In, D. S.; Chung, H.-J.; Liu, J. R. *Plant Cell Reports* **2005**, *23*, 557.

- (57) Shibuya, M.; Nishimura, K.; Yasuyama, N.; Ebizuka, Y. *FEBS Letters* **2010**, *584*, 2258.
- (58) Wendt, K. U.; Poralla, K.; Schulz, G. E. *Science* **1997**, *277*, 1811.
- (59) Achnine, L.; Huhman, D. V.; Farag, M. A.; Sumner, L. W.; Blount, J. W.; Dixon, R. A. *The Plant Journal* **2005**, *41*, 875.
- (60) Kohara, A.; Nakajima, C.; Hashimoto, K.; Ikenaga, T.; Tanaka, H.; Shoyama, Y.; Yoshida, S.; Muranaka, T. *Plant Molecular Biology* **2005**, *57*, 225.
- (61) Meesapyodsuk, D.; Balsevich, J.; Reed, D. W.; Covello, P. S. *Plant Physiology* **2007**, *143*, 959.
- (62) 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**.
- (63) 張亦諄, 利用飽和定點突變方法針對酵母菌氧化鯊烯環化酵素內 Ile705 和豌豆氧化鯊烯- β -麥胚固醇環化酵素假設活性區內的 Leu734 兩者的結構影響在環化及重組過程中的功能性分析 碩士論文, 國立交通大學生物醫學研究所 **2009**.
- (64) 劉媛婷, 利用突變策略針對氧化鯊烯環化酵素進行其結構與功能及其產物專一性/多樣性之研究 博士論文, 國立交通大學生物科技研究所 **2010**.