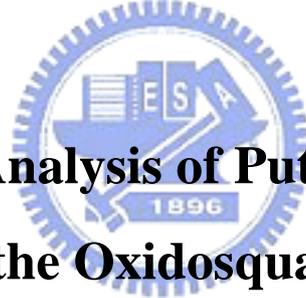


國立交通大學

生物科技研究所

碩士論文

利用定點突變對氧化鯊烯環化酵素的  
假設活性區進行功能性分析



**Functional Analysis of Putative Active Site  
Residues in the Oxidosqualene-Lanosterol  
Cyclase by Site-Directed Mutagenesis**

研究生：虞美婷

指導教授：吳東昆 博士

中華民國九十四年七月

利用定點突變對氧化鯊烯環化酵素的  
假設活性區進行功能性分析

**Functional Analysis of Putative Active Site Residues  
in the Oxidosqualene-Lanosterol Cyclase  
by Site-Directed Mutagenesis**

研究生：虞美婷

Student : Mei -Ting Yu

指導教授：吳東昆 博士

Advisor : Dr. Tung- Kung Wu



A Thesis

Submitted to Department of Biological Science and Technology

College of Science

National Chiao Tung University

in partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of

Master

in

Biological Science and Technology

July, 2005

Hsinchu, Taiwan, Republic of China

中華民國九十四年七月

## 利用定點突變對氧化鯊烯環化酵素的假設活性區進行功能性分析

研究生：虞美婷

指導教授：吳東昆老師

### 摘要

氧化鯊烯環化酵素(Oxidosqualene cyclase, OSC), 催化直鏈狀的氧化鯊烯經單一步驟環化生成四環或五環的三萜類。不同物種(氧化)鯊烯環化酵素活性區上的差異, 誘導酵素進行不同的摺疊, 形成產物的多樣性及複雜性。

為了解氧化鯊烯環化酵素假設活性區之胺基酸與受質環化/重組催化機制的關係, 以同屬之鯊烯環化酵素(Squalene-Hopene cyclase, SHC)的 X-ray 晶體結構為模板, 經序列比對推估出 OSC 的 29 個可能活性區位置, 以定點突變進行環化重組的機制研究。經質體交換(plasmid shuffle)初步篩選發現有 9 個突變點(OSC<sup>F104T</sup>、OSC<sup>H146A</sup>、OSC<sup>W232A</sup>、OSC<sup>W232R</sup>、OSC<sup>H234A</sup>、OSC<sup>M532A</sup>、OSC<sup>W587A</sup>、OSC<sup>F699A</sup> 與 OSC<sup>Y707A</sup>)無法存活, 可能代表這些突變位置是催化反應的重要影響點。培養此 9 個含 OSC 突變株的酵母菌, 經由產物分離與結構鑑定, 以推測這些胺基酸在環化機制上所扮演的催化角色。

在 OSC<sup>W232A</sup>、OSC<sup>H234A</sup> 突變株有新產物發現, OSC<sup>W232A</sup> 與實驗室另一個突變株 OSC<sup>H234Y</sup> 產物相同, OSC<sup>H234A</sup> 另多了一個未知物, 進一步純化分離, NMR 鑑定未知物結構為 Protosta-20,24-dien-3 $\beta$ -ol。藉由建構 OSC<sup>W232A</sup>、OSC<sup>H234A</sup> 產物圖譜, 推論 OSC<sup>W232A</sup>、OSC<sup>H234A</sup> 在催化反應中調節環化的重組步驟, 可能扮演穩定碳陽離子及脫氫的功能性角色。

為了更進一步探討 OSC<sup>W232</sup> 在環化機制的功用, 進行飽和突變實驗(Saturated mutagenesis), 將此位置胺基酸突變成其餘 19 種氨基酸, 觀察產物變化探討催化的功能性。利用氣相層析/質譜比對, 發現有 5 個突變產物, 除了 OSC<sup>W232A</sup> 原本的 3 個突變產物, 另有 2 個未知物滯留時間 26 min 及 26.5 min, 目前正進一步分離此 2 個未知物, 同時利用質譜及銀染 TLC 片推估此二者結構。並建構這些突變點的電腦模擬圖, 進一步佐證 W232 在催化的功能角色。

# Functional Analysis of Putative Active Site Residues in the Oxidosqualene-Lanosterol Cyclase by Site-Directed Mutagenesis

Student: Mei-Ting Yu

Advisor: Dr. Tung-Kung Wu

## Abstract

Oxidosqualene cyclases (OSCs) constitute a family of enzymes which catalyze the conversion of linear oxidosqualene into polycyclic tetracyclic and pentacyclic triterpenoids in a one-step enzyme-catalyzed reaction. The OSC-catalyzed cyclization/rearrangement reaction represents one of the most remarkable and fascinating biotransformations found in nature. In order to clarify the function of the amino acid residues located on the putative active site cavity surface of oxidosqualene-lanosterol cyclase of yeast *Saccharomyces cerevisiae*, site-directed mutagenesis coupled with plasmid shuffle experiments were carried out. Following the assaying of twenty-nine alanine-scanning mutants for the complementation of yeast viability, nine inactive mutants (OSC<sup>F104T</sup>, OSC<sup>H146A</sup>, OSC<sup>W232A</sup>, OSC<sup>W232R</sup>, OSC<sup>H234A</sup>, OSC<sup>M532A</sup>, OSC<sup>W587A</sup>, OSC<sup>F699A</sup> and OSC<sup>Y707A</sup>) were further analyzed for product profile. Further product isolation and characterization of each mutant showed that OSC<sup>W232A</sup> mutant produced Protosta-12,24-dien-3 $\beta$ -ol, Lanosterol and Parkeol as end products, exhibiting the same product profile as that of OSC<sup>H234Y</sup> mutant. In parallel, the OSC<sup>H234A</sup> mutant produced Protosta-12,24-dien-3 $\beta$ -ol, Lanosterol, Parkeol, and Protosta-20,24-dien-3 $\beta$ -ol as end products.

To completely characterize the functional role of W232 in OSC activity, the saturated mutagenesis experiments at W232 position were performed. Following the analysis of each mutant products, two additional new products with retention time (rt.) at 26.0 and 26.5 min were observed on GC-MS spectrometry. The EI low mass spectrum of rt. 26 min product showed a molecular ion at  $m/z$  426 and fragment peaks at 357 ( $[M-C_5H_9]^+$ ) and 313 ( $[M-C_8H_{15}-H_2]^+$ ), suggesting an intact tetracyclic ring. In summary, the results suggest a role for W232 in stabilizing a cationic intermediate, probably after protosteryl cation formation, and in determining the deprotonation position for diverse product profile.

## 謝 誌

即將告別二年的碩士生活，當中有期許、有挫折、有失落，一一的完成克服，感覺上完成了人生的一個階段，即將要展開人生的下一關挑戰。兩年研究所生涯在我浩瀚的人生當中也許只佔小小的比例，但卻讓我獲益良多。不同與以往的生活經歷，科學研究及做實驗佔了生活的大部分時間，實驗總是會遇到不同的困難，計畫永遠趕不上變化，我從中學習到積極面對事情、堅持到底的精神。我覺得科學研究者必須具備理性與感性，面對許多挑戰與困難，必須要有很強的熱情、無比的毅力與永不服輸的精神，以及冷靜的邏輯思考與細心的分析。在研究所兩年的日子裡，學到許多科學概念與實驗技術，週遭的人事物實在令我獲益不少。

首先要感謝我的指導教授吳東昆博士，感謝老師二年前以無比的勇氣收了不曾摸過 pipette 的我，老師對實驗設計、科學理念以及實驗技術上的細心指導帶給我不少的啟發，從老師身上我也學到了處事積極的態度與獨立思考的能力。另外也要感謝應化系李耀坤教授與淡江化學系的鄭建中博士，於口試期間對於論文細心的審閱與修改，並且提供寶貴的經驗與建議使此論文能夠更盡完整，並感謝清大貴儀中心彭菊蘭小姐，在 NMR 分析上的幫忙。

兩年的研究生活，感謝程翔學長亦師亦兄的照顧及在實驗上的指導，還要特別感謝媛婷學姊不厭其煩的教導實驗技巧與建議，學姊總是用她超乎常人的樂觀激勵我，她 color 般閃亮積極的態度推動了這本論文的產生，不知何時，感覺上有了亦師亦友的情誼。

還有同窗的夥伴吳家四千金-希希、小八、晉豪，雖然晉豪很早就單飛躍升為中草藥一哥，還是要感謝豪哥在 GC/MS 上的協助。小八總是以她犀利及獨到的見解在我實驗陷入膠著時給予幫助，而小希以她北極企鵝般的冷笑話使我的生活酷涼有勁，真不愧是我冷笑話軍團的成員。也要感謝大仔碩一時在生物晶片方面的指導，使我眼界開拓不少。還有令宗、宏明、大鳥、天才源、駿哥、文暄、大景、怡親、浩宇等可愛的學弟妹們，在實驗上的協助及閒暇之餘所帶來的歡樂。

還要感謝我的家人支持我完成學業，謝謝你們！

謹將此論文獻給所有關心我的人……！

# 目錄

中文摘要 .....	i
英文摘要 .....	ii
謝誌.....	iii
目錄 .....	iv
圖目錄 .....	vi
表目錄 .....	ix

## 第一章 序論

1-1 固醇類及三萜類化合物對生物體的重要性.....	1
1-2 三萜類環化酵素家族的簡介 .....	6
1-3 氧化鲨烯環化酵素家族的簡介 .....	13
1-3-1 氧化鲨烯-羊毛硬脂醇環化酵素 (OSC) .....	15
1-3-2 氧化鲨烯-環阿屯醇環化酵素 (CAS ) .....	27
1-3-3 鲨烯-蛇麻烯環化酵素 ( SHC ) .....	32
1-4 (氧化)鲨烯環化酵素之胺基酸序列比對 .....	36
1-5 研究目的 .....	42

## 第二章 實驗材料與方法

2-1 實驗材料 (Material) :	
2-1-1 化學藥品與材料 .....	49
2-1-2 儀器 .....	50
2-1-3 菌株與載體 .....	50
2-1-4 溶液與緩衝液 .....	51
2-1-5 培養基 .....	52
2-2 實驗方法 (Method) :	
2-2-1 重組質體的建構 ( The Construction of recombinants )..	54

2-2-2	質體 DNA 轉入活細胞中.....	61
2-2-3	質體交換 / 死/活篩選 .....	63
2-2-4	麥角固醇補充篩選 .....	64
2-2-5	酵母菌的培養 .....	65
2-2-6	脂質萃取 .....	65
2-2-7	薄層色層分析及管柱液相色層分析 .....	65
2-2-8	硝酸銀矽膠管柱液相色層分析.....	67
2-2-9	建構突變點電腦模擬圖 .....	70

### 第三章 結果與討論

3-1	篩選目標 .....	71
3-2	質體交換 / 反向篩選 .....	72
3-3	產物分析與探討 .....	76
3-4	W232 的細部探討.....	86
	3-4-1 由序列比對探討 Trp232 在催化上角色.....	86
	3-4-2 W232 saturated mutagenesis 突變株的建構與產物分析.....	91
3-5	藉電腦模擬圖佐証突變效應影響的產物圖譜.....	104

### 第四章 結論與未來展望 .....

116

### 第五章 參考文獻 .....

119

### 附 錄.....

123

# 圖目錄

圖 1-1	固醇類合成途徑 .....	5
圖 1-2	環化酵素家族在不同物種間的產物專一性.....	7
圖 1-3	氧化鯊烯的環化機制-經不同碳陽離子中間物有產物多樣..	9
圖 1-4	高等植物中的 CAS 與 LUS 環化假設機制.....	12
圖 1-5	Johnson Model.....	16
圖 1-6	Griffin 提出 Aromatic Hypothesis 理論模組.....	17
圖 1-7	酵素催化環氧化物開環及環化起始的假設模組... ..	18
圖 1-8	不同物種 CAS1 基因與 ERG7 基因之高度保留胺基酸...19	
圖 1-9	酵母菌( <i>S.c</i> ) OSC <sup>Val454</sup> 突變株可能進行的環化過程.....	20
圖 1-10	人類 OSC X-ray 晶體結構.....	21
圖 1-11	人類 OSC與膜結合時的X-ray 晶體結構.....	22
圖 1-12	OSC催化直鏈的氧化鯊烯環化成四環羊毛硬脂醇的機制..	23
圖 1-13	Asp455與Cys456及Cys533氫鍵拉扯誘導Epoxide開環.....	24
圖 1-14	OSC酵素活性區的芳香族基團 .....	26
圖 1-15	人類OSC表面活性區胺基酸.....	26
圖 1-16	CAS與OSC間有高度保留性的胺基酸.....	28
圖 1-17	不同物種氧化鯊烯-環阿屯醇環化酵素在阿拉伯芥 CAS H477 有高度保留.....	29
圖 1-18	阿拉伯芥 CAS 正常途徑合成物及突變點生成的產物.....	29
圖 1-19	同源性的鯊烯環化酵素與氧化鯊烯-羊毛硬脂醇環化酵素有 類似的環化機制.....	32
圖 1-20	SHC 之 X-射線晶體結構圖.....	33
圖 1-21	以 OSC 抑制劑說明環化起始反應.....	34
圖 1-22	OSC、CAS、SHC 的序列比對圖.....	37
圖 1-23	Q-W 區域在環化酵素家族內之分佈情形.....	41
圖 1-24	不同物種環化酵素活性區些微差異形成物種專一性產物...44	
圖 1-25	實驗動機之假設.....	47
圖 1-25	實驗策略流程.....	48

圖 2-1	QuickChange Site-Directed Mutagenesis 選殖策略 .....	55
圖 2-2	以切接選殖建構雙點突變的策略.....	59
圖 3-1	以 SHC X-ray 結構為模板，分子模擬 OSC 可能活性區位置對照圖，及所建構的突變株.....	71
圖 3-2	質體交換/反向篩選策略圖.....	73
圖 3-3	9 個突變株轉入 TKW14C2 在 TLC 片的初步產物分布...	76
圖 3-4	以 GC-MS 分析突變產物，建構 W232A、H234A 產物圖	78
圖 3-5	產物進行乙醯化反應.....	80
圖 3-6	以 GC-MS 確認經銀染矽膠管柱層析分離的 H234-unknown acetate 純度.....	81
圖 3-7	H234A-unknown <sup>1</sup> H NMR.....	81
圖 3-8	H234A-unknown <sup>13</sup> C NMR.....	82
圖 3-9	H234A-unknown HSQC.....	82
圖 3-10	H234A-unknown 專一的結構訊息.....	83
圖 3-11	新產物 Protosta-20,24-dien-3β-01 的結構圖.....	84
圖 3-12	由產物圖譜推估 W232、H234 參與的環化重組途徑....	89
圖 3-13	Trp232 及 His234 在酵母菌氧化鯊烯-羊毛硬脂醇環化酵素 (OSC)電腦模擬圖中與產物之間的空間關係圖.....	90
圖 3-14	140L W232I-rt.26 min 未知物通銀染純化送測 NMR 前的 GC-MS.....	94
圖 3-15	銀染 TLC 片以乙醚為展開液的產物展佈順序.....	95
圖 3-16	rt.26 min 未知物乙醯化前後 MS 圖.....	97
圖 3-17	標準品乙醯化前的 MS 圖譜對照圖.....	98
圖 3-18	標準品乙醯化的 MS 圖譜對照圖.....	99
圖 3-19	Protosta-12,24-dien-3β-ol 乙醯化前後 MS 圖.....	100
圖 3-20	以已知化合物的 Mass 圖譜推估 rt. 26.5 min 未知物結構	

資訊.....	102
圖 3-21 Trp232Ala/Tyr510Ala 雙點突變產物與控制組的 GC-MS 比對圖.....	114
圖 3-22 Trp232Ala/Tyr510Lys 雙點突變產物與控制組的 GC-MS 比對圖.....	114
圖 3-23 Trp232Ala/His234Ala 雙點突變產物與控制組的 GC-MS 比對圖.....	115
圖 3-24 His234Ala/Tyr510Ala 雙點突變產物與控制組的 GC-MS 比對圖.....	115



# 表目錄

表 1-1	酵母菌 OSC <sup>Val454</sup> 突變株產物.....	20
表 1-2	阿拉伯芥 CAS 已被報導的定點突變產物及比例分布...	30
表 2-1	Quick-Change Site-Directed Mutagenesis 所用材料條件...	57
表 2-2	Quick-Change Site-Directed Mutagenesis 使用之聚合酵素放大程式.....	57
表 2-3	Quick-Change Site-Directed Mutagenesis PCR 產物處理...	58
表 2-4	接合反應前以適當限制酵素處理質體 DNA 的條件.....	60
表 3-1	OSC 假設活性區建構的突變點進行質體交換/反向篩選將酵母菌 CBY57 篩出的突變株，轉入酵母菌 TKW14C-2 進行產物分析.....	74
表 3-2	利用序列比對得到 OSC、CAS、SHC 活性區及重要的鄰近胺基酸的對應表.....	87
表 3-3	W232 saturated mutagenesis 突變株建構及功能性互補結果	91
表 3-4	以 GC-MS 的標準品比對建構 W232 saturated mutagenesis 產物圖譜以及利用 GC 算出產物比例.....	93
表 3-5	W232 飽和突變株依產物比例分布的分類.....	104
表 3-6	突變點側鏈上胺基酸基團與各碳陽離子中間物的距離.....	106

# 第一章 序論

## 1-1 固醇類及三萜類化合物對生物體的重要性

固醇類的組成通常是四環~六環的固性結構，外有一個 8 個碳的側鏈，且在 C-3 有一羥基(-OH)者稱之。自然界的固醇類，例如：膽固醇、麥角固醇、 $\beta$ -麥胚固醇、植物固醇，以及其生合成代謝途徑中的上游產物與衍生物-三萜類天然物(Triterpenes)，他們的作用機制、生合成途徑、代謝調節，一直是近幾十年來的重要研究課題。

許多研究指出，這些固醇類及三萜類天然物，在生物體具有重要的生理功能。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，在幾個步驟的反應縮合後，經速率決定步驟 HMG-CoA 還原酶 (HMG-CoA reductase) 催化生成 3-甲基-3,5-羥基戊酸(Mevalonate)，再經一連串的 ATP 水解參與反應，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，產生疏水性的鯊烯(Squalene)，從鯊烯開始，固醇類生合成中間物變為未磷酸化、強疏水性、油脂狀的化合物，因此在生物體內需細胞外固醇攜帶蛋白(sterol carrier protein)來維持運送的溶解度。鯊烯再經氧化代謝生成氧化鯊烯，而後經由環化及一連串反應，合成其最終產物<sup>[1]</sup>。在不同物種間，會分別利用鯊烯或氧化鯊烯作為環化起始物。細菌、一些原核生物及低等植物會利用鯊烯環化生成蛇麻烯(Hopene)，而在高等植物、真菌、動物...等會由氧化鯊烯進行環化，經一連串反應生成植物固醇(phytosterol)、麥角固醇(Ergosterol)、膽固醇(圖 1-1)。

過去文獻指出固醇類生合成途徑的中間物參與很多重要的生理反應<sup>[2]</sup>。如異戊二烯類中間物(Isoprenoid intermediates)是泛醌

(Ubiquinone)、多萜醇(Dolicol)、血基質(Heme)及植物脂質萜類、胡蘿蔔素( $\beta$ -carotene)...等數種重要化合物的前驅物。血基質與紅血球的形成、攜氧及合成數種血基質蛋白質有關(如：細胞色素 P450 (cytochrome P450)、電子傳遞鏈上的蛋白複合體...等)。泛醌，亦為輔酶 Q(Coenzyme Q)，廣泛存於大部分的細胞中，參與能量代謝的電子傳遞，可傳遞電子協助氧化還原反應<sup>[1]</sup>，目前已被製成健康食品，其具有抗氧化、強化免疫的功效，可抑制氧化型低密度脂蛋白，預防心血管疾病。多萜醇與內質網中蛋白質的糖化有關，負責作為 N-糖苷鍵(N-linked glycosides)的多糖攜帶者。植物固醇(phytosterol)可與食物中的膽固醇競爭其與膽酸的結合，因此可阻礙膽固醇吸收，降低心血管疾病的風險，且植物固醇可提高免疫能力，幫助自然殺手細胞(NK cell)運作。鯊烯是一種三萜類化合物，為一種強力的攜氧物質，由於其結構的特殊性，與水作用可產生 3 個氧，因此主要的功能為細胞活化及生氧作用，可提高內臟功能，避免細胞缺氧，以及調節膽固醇總量，預防心血管疾病。此外，在動物體內產生的膽固醇參與體內許多新陳代謝的重要生理調控，它是細胞膜上重要組成份，調控細胞膜的流動性，影響胞內外物質的滲透，並且可藉此調控膜上蛋白質或膜結合酵素，使其有最適活性去進行訊息傳遞、代謝反應與催化作用<sup>[3]</sup>。另外，膽固醇也是膽汁、固醇類荷爾蒙、胞內生理代謝調控的重要物質。膽固醇在體內代謝生成膽汁而幫助脂質及脂溶性維生素的吸收，它也是體內五種固醇類激素的前驅物：糖皮質固醇(Glucocorticoids；如：皮質醇 Cortisol)、礦物皮質固醇(Mineralocorticoids；如：醛固酮 Aldosterone)、雄性激素(Androgens)、雌激素(Estrogens)與黃體酮(Progestins)，透過這些激素，使人體可面對不同的生理壓力，它們可調控營養素的降解、吸收、生合成作用及免疫發炎反應，並可調節水

份、礦物質吸收再利用與排出，使其代謝平衡，並影響男女性徵成熟與發育。而人體也可利用膽固醇，自行合成脂溶性維生素 D，維生素 D 是一群具有激素樣功能的固醇，繼而影響鈣質吸收，血鈣與骨鈣迴饋循環平衡，刺激基因表現與骨質的強度<sup>[1]</sup>。此外，膽固醇也是目前正被積極研究的 Lipid raft(脂質筏)的組成分。Lipid raft 是指細胞膜上一塊固性區域，當細胞膜上膽固醇比例增加，細胞膜的流動性會減少，許多研究發現，細胞膜上有一塊區域富含膽固醇，因而較不具流動性，就像筏在流動性的膜上移動，故此稱為脂質筏<sup>[4]</sup>。Lipid raft 普遍存於所有細胞膜上，許多文獻的研究指出，其可能與訊息傳遞、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)<sup>[5]</sup>，目前很多文獻在探討阿茲海默症與 Lipid raft 的相關性，實驗證實當 Lipid raft 被破壞或組成改變， $\beta$ -amyloid ( $\beta$ -類澱粉樣蛋白)在腦中的含量會減少，阿茲海默症的成因就是因為這種蛋白不正常的沈積在腦中而造成的，目前許多研究都傾向此疾病是某些物質透過 Lipid raft 引發訊息傳遞，繼而造成此種絲狀病變蛋白形成的假說<sup>[4,6]</sup>。而膽固醇則是 Lipid raft 的主要組成份，因此，針對固醇類的研究更是日益重要<sup>[5]</sup>。此外，在酵母菌的實驗也發現，部份具特定結構的固醇類，以及其相應的激素，對於細胞分裂增生週期的調控，有密切的相關性。因此，固醇類及三萜類天然物在酵母菌、動、植物細胞一直被廣泛的注意著<sup>[7,8]</sup>。

固醇類在生命體具有一自然的迴饋調節機制，使體內的固醇含量達一恆定，假若此調節機制失效，又或人體長期攝食高膽固醇飲食，會使得血液中膽固醇含量升高，而人體血液裡主要負責膽固醇運輸的脂蛋白-LDL(Low density lipoproteins；低密度脂蛋白)也會相應增加，此時若人體受到自由基攻擊，又或處於高氧化壓力之下，血液循環中

的 LDL 會被修飾化，也就是進行乙醯化作用或 LDL apo B (LDL apolipoprotein B，低密度脂蛋白表面脂蛋白 B)被氧化形成 ox-LDL(氧化型低密度脂蛋白)，此時會被循環中的巨噬細胞(Macrophages)所帶有的清道夫受器(Scavenger receptor)所辨識而引發內噬作用，移入血管內皮的巨噬細胞攝取了這些修飾型的 LDL，而這些修飾型的 LDL 並無法參與細胞內膽固醇正常代謝的迴饋調節機制，因而他們所攜帶的膽固醇會過量聚積在巨噬細胞內，造成巨噬細胞轉形變成泡沫細胞(foam cell)，泡沫細胞在內皮細胞的沈積釋出生長因子，刺激平滑肌的分化及血管壁上鈣化斑痕的形成，使得血管變狹窄阻塞、彈性變差，有粥狀斑塊出現，因而造成了高血壓、心臟病、動脈粥狀硬化、中風...等心血管疾病的發生。而在黴菌當中，其終產物麥角固醇(Ergosterol)為黴菌胞膜上的重要組成，也是不可或缺的存活因子，因此，目前許多先進的分子生物技術已被大量用來研究生命體中固醇類及三萜類天然物的重要性，了解其代謝上的反應途徑，而能用以發展抗黴菌及降膽固醇的藥物<sup>[9, 10]</sup>。因為心血管疾病為國人十大死因之一，也是許多已開發國家的主要致死因素。另一方面，由於院內感染、癌症治療、器官移植或其他治療，導致免疫力降低引發的黴菌感染日益嚴重，故此，抗黴菌及降膽固醇的藥物的研究一直被持續進行著<sup>[11]</sup>。

近年來，固醇類生合成代謝途徑中的環化酵素--氧化鯊烯環化酵素(Oxidosqualene Cyclase)，已逐漸成為抗黴菌及降膽固醇的藥物研發標的。先前所發展的藥物及相關研究的抑制劑，多針對固醇類生合成途徑的限速步驟酵素 HMG-CoA Reductase 做抑制，但此方式會影響其下游的異戊二烯中間物與三萜類化合物的生成，繼而影響具有重要生理功能的二次代謝物的形成與調節，如：泛醌、多萜醇...等。所以，選擇下游的氧化鯊烯環化酵素做為藥物標的，可減少二次代謝物形成

受抑制所引起的副作用<sup>[11]</sup>。此外，由於此環化酵素的環化反應，涉及了包括幾十個鍵的斷裂、形成及碳骨架的重排、去質子化步驟(終止脫除反應)，如此高效率的一步環化反應，更強烈的引發我們想去探究的興趣。

## ***Sterol Biosynthetic Pathway***

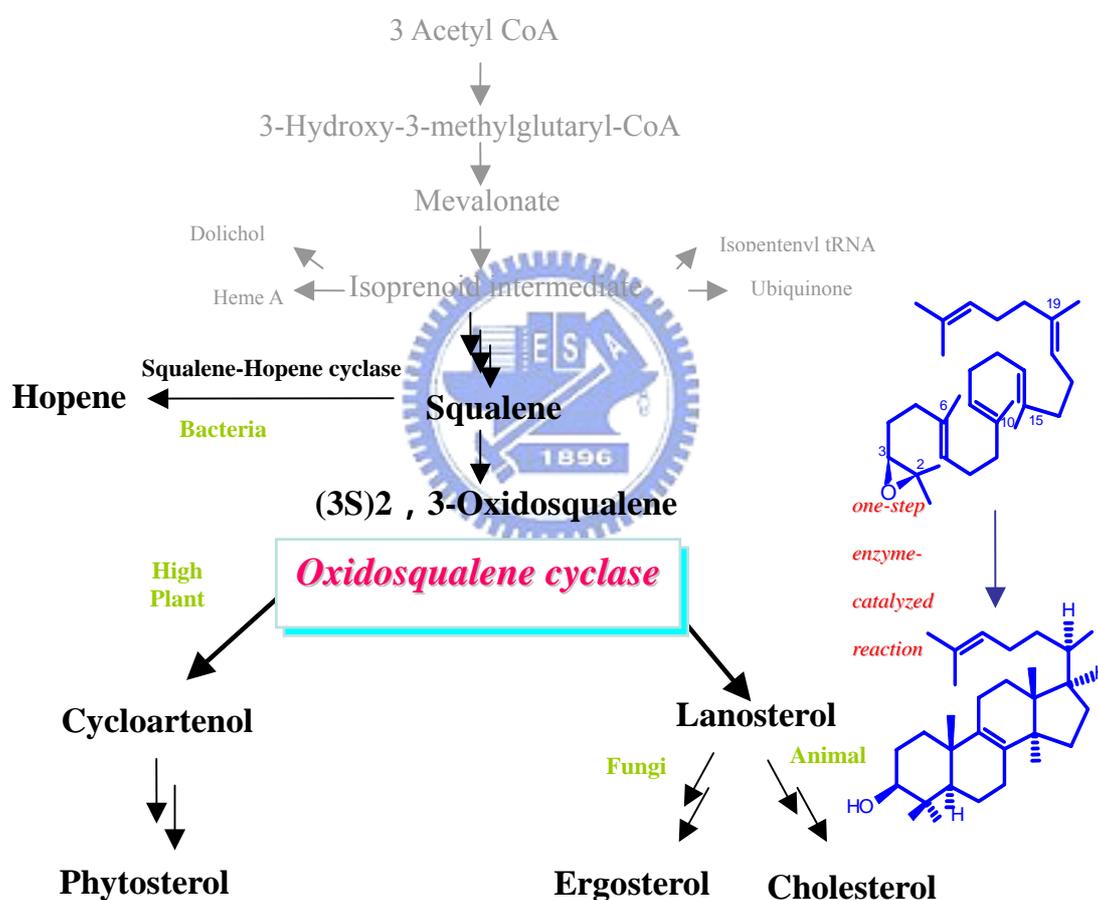


圖 1-1: 固醇類生合成途徑

## 1-2 三萜類環化酵素家族的簡介

近半世紀以來，三萜類環化酵素家族所催化鯊烯(Squalene)或氧化鯊烯((3*S*)-2,3-oxidosqualene)環化形成多環多烯類(terpenes)的催化機制，一直是分子生物家及化學家認為最迷人及最具挑戰性的生化轉化反應之一。三萜類化合物(Triterpenoid)是一群由三十個碳前驅物衍生而來的多烯類產物，目前，由天然來源、酵素立體結構相關的環化作用轉化而來的有近 200 個不同多烯類骨架的三萜類化合物<sup>[12]</sup>。這些具多烯類骨架的三萜類化合物，是由自然界三萜類環化酵素家族，經單一步驟酵素催化反應，藉酵素與受質間的鏡像或立體選擇性環化及骨架重排，生成了如此多樣的產物，而這些產物泛存於自然界的各物種中形成產物多樣性。

在不同物種間依其所使用之酵素，將直鏈多烯類的鯊烯或環氧化物的氧化鯊烯以單一生物轉化過程，催化多個不對稱立體中心的環化及 1,2-氫化基(hydride)、甲基轉移，而獲得不同結構的多環脂醇或三萜類化合物<sup>[13]</sup>。整個環化過程包括雙鍵或 Epoxide(環氧化物)質子化(Protonation)以活化誘導開環、環化(Cyclization)、甲基與氫鍵之重組(Rearrangement)、脫除(Elimination)之終止反應。這些同源性(Homologous)的三萜類環化酵素，可將直鏈狀的鯊烯或氧化鯊烯(OS)轉化成多樣產物，且在蛋白質序列上有相似的胺基酸保留區域位置。

這些物種催化生成的物種專一性產物(圖 1-2)，依反應的產物骨架的複雜性區分，有 6-6-6-5 四環、6-6-6-6-5 五環、6-6-6-6-6 五環及單環、雙環、三環與六環的三萜類化合物<sup>[12]</sup>。例如在動物、真菌、甲基營生菌(methylotrophic bacterium)，氧化鯊烯會藉氧化鯊烯-羊毛硬脂醇環化酵素(Oxidosqualene-Lanosterol Cyclase;OSC)催化生成 6-6-6-5 四環的羊毛硬脂醇(Lanosterol ; LA)。在較高等的植物與藻類

中，氧化鯊烯可被環阿屯醇合成酵素(Cycloartenol Synthase ; CAS) 環化生成 6-6-6-5 四環的環阿屯醇(cycloartenol)，或是藉羽扇醇合成酵素(Lupeol Synthase ; LUS ) 合成 6-6-6-6-5 五環的羽扇醇(Lupeol)，或是藉香桂素合成酵素(Amyrin Synthase ; AMS) 生成 6-6-6-6-6 五環的  $\alpha$ - 香桂素( $\alpha$ -Amyrin) 或  $\beta$ -香桂素( $\beta$ -Amyrin)，又或藉其他環化酵素環化形成四環~六環的產物。而在較低等的植物、部分原蟲類(Protozoa) 及細菌中,藉由鯊烯-蛇麻烯環化酵素(Squalene - Hopene Cyclase ; SHC) 將直鏈的鯊烯環化生成 6-6-6-6-5 五環的蛇麻烯(Hopene)， 或藉其他環化酵素反應生成蛇麻醇(Hopanol) 和里白醇(diplopterol) 等環狀產物。另外在 *Achillea odorata* 及 *Camellia sasanqua* 之中，雖然無法獲得 Achilleol synthase 及 Camelliol synthase 的選植株，但仍可從其中分離出單環的 Achilleol A 及 Camelliol C<sup>[14]</sup>(圖 1-3)。

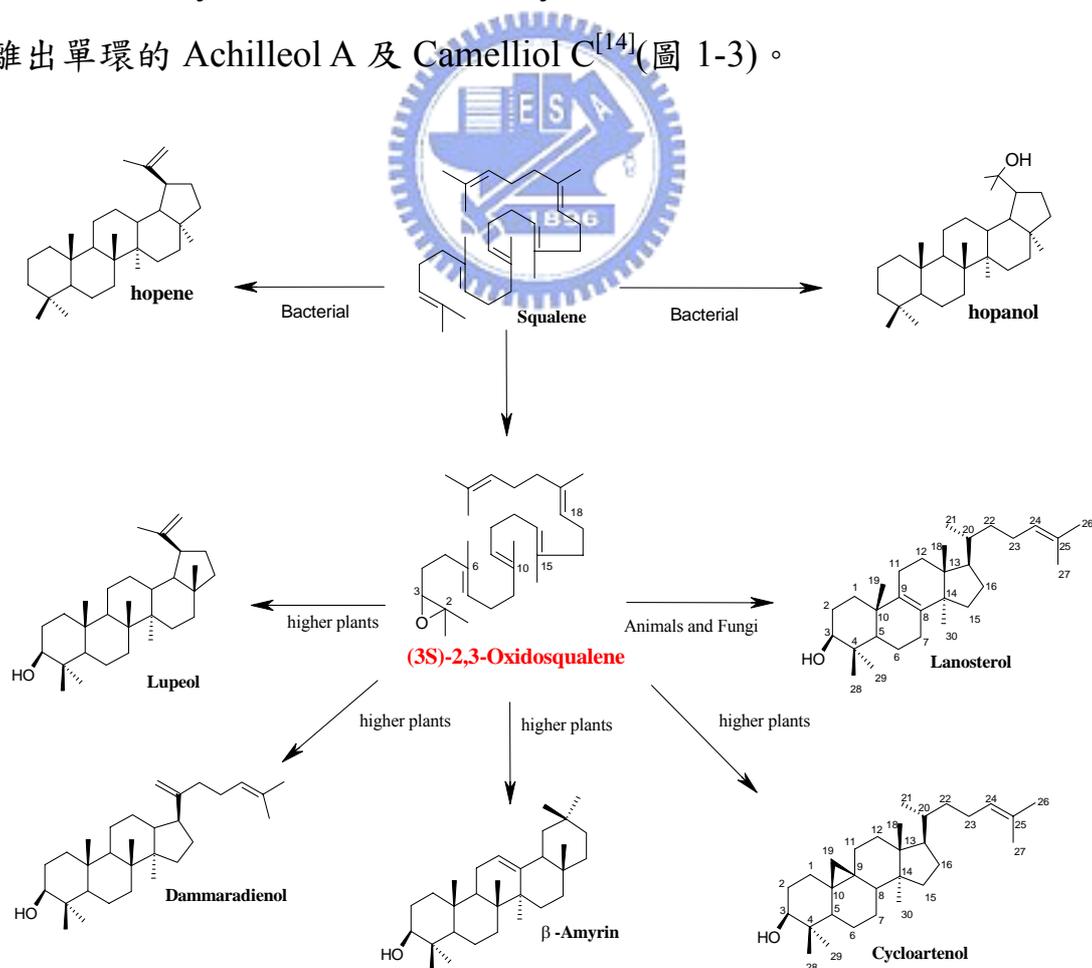
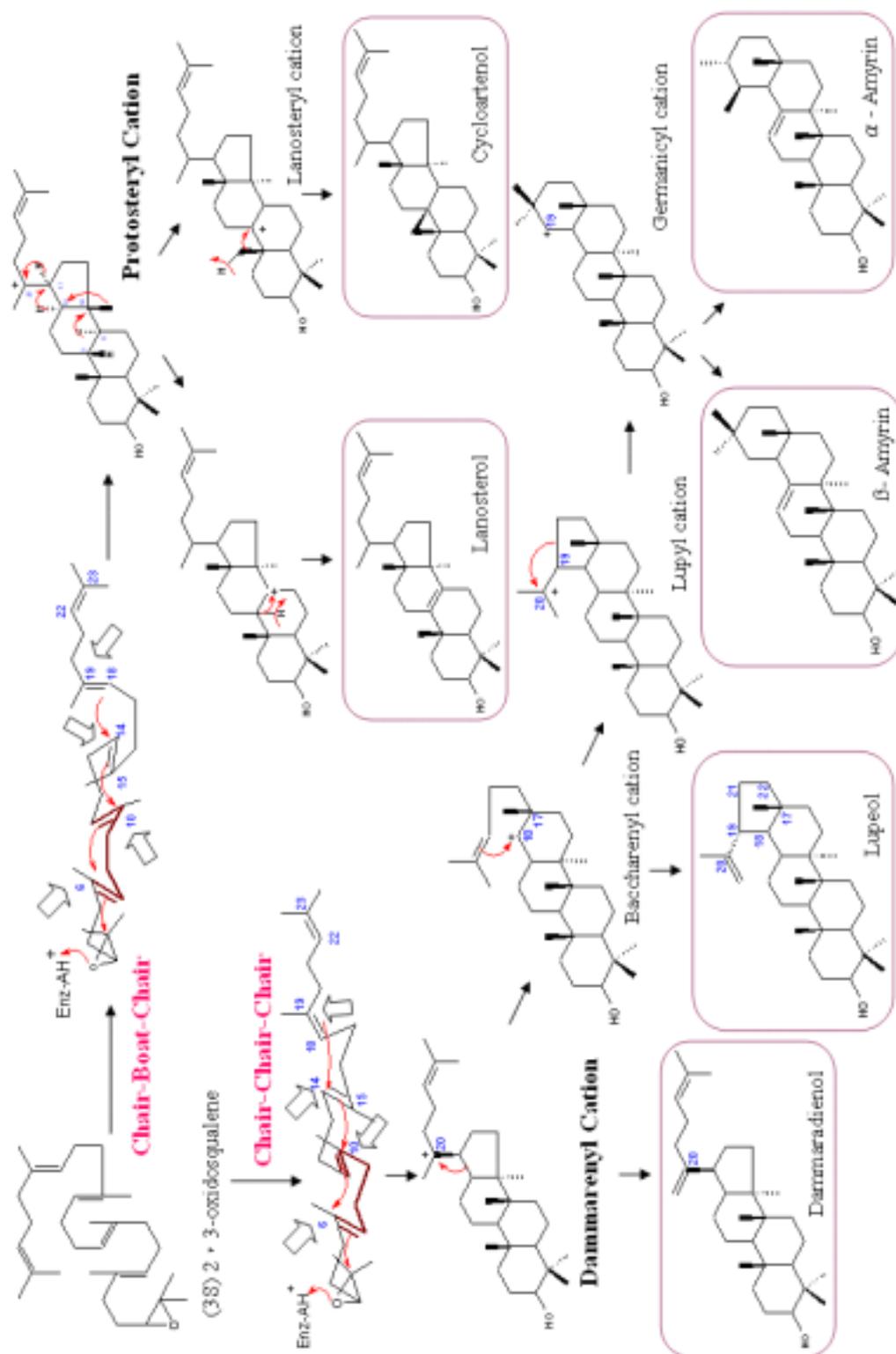


圖 1-2：環化酵素家族在不同物種間的產物專一性

這些三萜類環化酵素家族催化生成的產物多樣性，開始是藉環化酵素中所含殘基(Residue)，使得親核性的雙鍵或 Epoxide 藉親電性作用進行開環起始反應，經一連串的碳陽離子-烯烴環化作用(cation-olefin cyclization)生成高能帶正電的碳陽離子中間物(cation intermediates)。鯊烯在其環化酵素當中，會依全椅形的形式(all-chair form)摺疊，而氧化鯊烯在氧化鯊烯環化酵素中，經不同物種環化酵素上殘基的誘導，會依椅形-船形-椅形(chair-boat-chair)或椅形-椅形-椅形(chair-chair-chair) 二種方式摺疊，繼而進行上述的開環形成碳陽離子中間物的反應<sup>[15]</sup>。

由於相同反應受質-氧化鯊烯在酵素中不同的摺疊方式，會造成立體構形相異的反應機制，經質子化及一連串的雙鍵電子轉移後，會生成二種類型的碳陽離子中間物：(一) chair-boat-chair 會生成原脂醇碳陽離子中間物(Protosteryl Cation intermediates)，之後經甲基、氫化基轉移的重排重組作用，在不同位置脫氫或藉水分子作用，中止反應而形成環阿屯醇、羊毛硬脂醇和南瓜子雙烯脂醇(Cucurbitdienol)。(二) chair-chair-chair 會形成達瑪烯碳陽離子中間物(Dammarenyl Cation intermediates)，在不同酵素中，有些繼續誘導環化，形成 6-6-6-6-5 及 6-6-6-6-6 五環的碳陽離子中間物，繼而再經甲基、氫化基轉移的重排重組，各自環化生成達瑪雙烯醇(Dammaradienol)、羽扇醇、 $\alpha$ -香桂素及  $\beta$ -香桂素...等<sup>[16-18]</sup>。



圖：氧化蒎烯的環化機制，經不同碳陽離子中間物環化，形成複雜的多樣性環化產物

而另一方面，三萜類環化酵素所催化的環化反應其反應本身的複雜性，吸引許多研究學者來了解其酵素所催化反應的反應機制，及探討其酵素本身的結構與功能間的關係。早期對環化酵素機制的研究，是利用反應受質的類似物進行催化，藉由分析酵素轉化生成結構的構形範圍及產物的特性，推估其作用機制<sup>[13]</sup>。由於反應受質類似物其立體或電子上的差異，可能對酵素的受質結合區或活性區參與環化的殘基有斥力的交互作用，繼而影響了受質在酵素的結合摺疊，如:11-fluorooxidosqualene(11-氟氧化鯊烯)的電子斥力會使其不傾向椅形-船形-椅形的重排。而 14-fluorooxidosqualene(14-氟氧化鯊烯)其碳 14 上所接的取代基(-F substituent)可能對碳 10 上的甲基有斥力交互作用，或是對鄰近的酵素受質結合的口袋區有排斥作用，使得受質在酵素中失去正確摺疊形式而喪失 Epoxide 活化開環的起始作用<sup>[14]</sup>。可利用此方法找出活性區上的殘基涉及的環化機制及影響哪一環的形成...等。

此外，一些對三萜類環化酵素的研究發現，環化酵素家族於高等生物中經分子演化下，酵素受質由較低等的鯊烯演化成需氧參與的較高等的氧化鯊烯。先前的研究對這些環化酵素提供的一些反應機制上的資訊。這些環化酵素利用其受質結合區的胺基酸誘導受質有正確的定位而進行摺疊，將環狀的氧化鯊烯或具對稱性的直鏈多烯類的鯊烯，能夠在各自的環化酵素中摺疊環化成具多個不對稱立體中心的多環脂醇或三萜類化合物，整過環化過程包含 Epoxide 或雙鍵質子化活化誘導開環、共價鍵斷裂與形成的環化、氫化基、甲基轉移的重排重組(rearrangement)、脫除(elimination)而至中止反應<sup>[19,20]</sup>。在酵素中經環化重組形成的過渡性高能碳陽離子中間物，最後會藉質子被抽取(Proton abstraction)、水及其他親核基團的加入而使反應中止形成產

物。酵素受質結合區與活性區胺基酸，藉其上的電子散佈及斥力而與受質有交互作用，當胺基酸改變，活性區上的立體構形受扭曲，會衝擊受質在酵素中的摺疊，活性區的電子散佈改變，會修飾環化、碳陽離子重排及脫氫的鍵形成之反應過程。

進一步來說，這些環化酵素在蛋白質序列上有相似的序列及胺基酸保留區，但因演化上的可塑性，使其構形序列上胺基酸因演化的過程而增加改變，生成新的催化特性，而引起自然界中的多樣性產物分佈。這些胺基酸廣泛變化，改變了酵素活性區胺基酸與受質間的交互作用，或反應過程的碳陽離子中間物，因此衝擊產物結構的形成，故而各物種的環化酵素有其產物專一性<sup>[21]</sup>。例如：環化酵素 CAS 與 LUS 同樣存在於高等植物中，因演化造成酵素活性區胺基酸的變化，使相同的反應受質氧化鯊烯，有不同的誘導摺疊形成，經酵素上質子的捕捉與給予、電子穩定過渡態中間物，CAS 會催化生成四環碳陽離子中間物，而 LUS 在產物的 D、E 環間有進一步的電子穩定作用，會繼續環化生成五環的碳陽離子中間物，而後各自再依活性區胺基酸的電子分佈，利用氫鍵拉扯效應、質子在鄰近的胺基酸位置與受質間轉移，電子穩定作用協助甲基、氫化基轉移重排，分別形成四環的環阿屯醇及五環的羽扇醇(圖 1-4)。

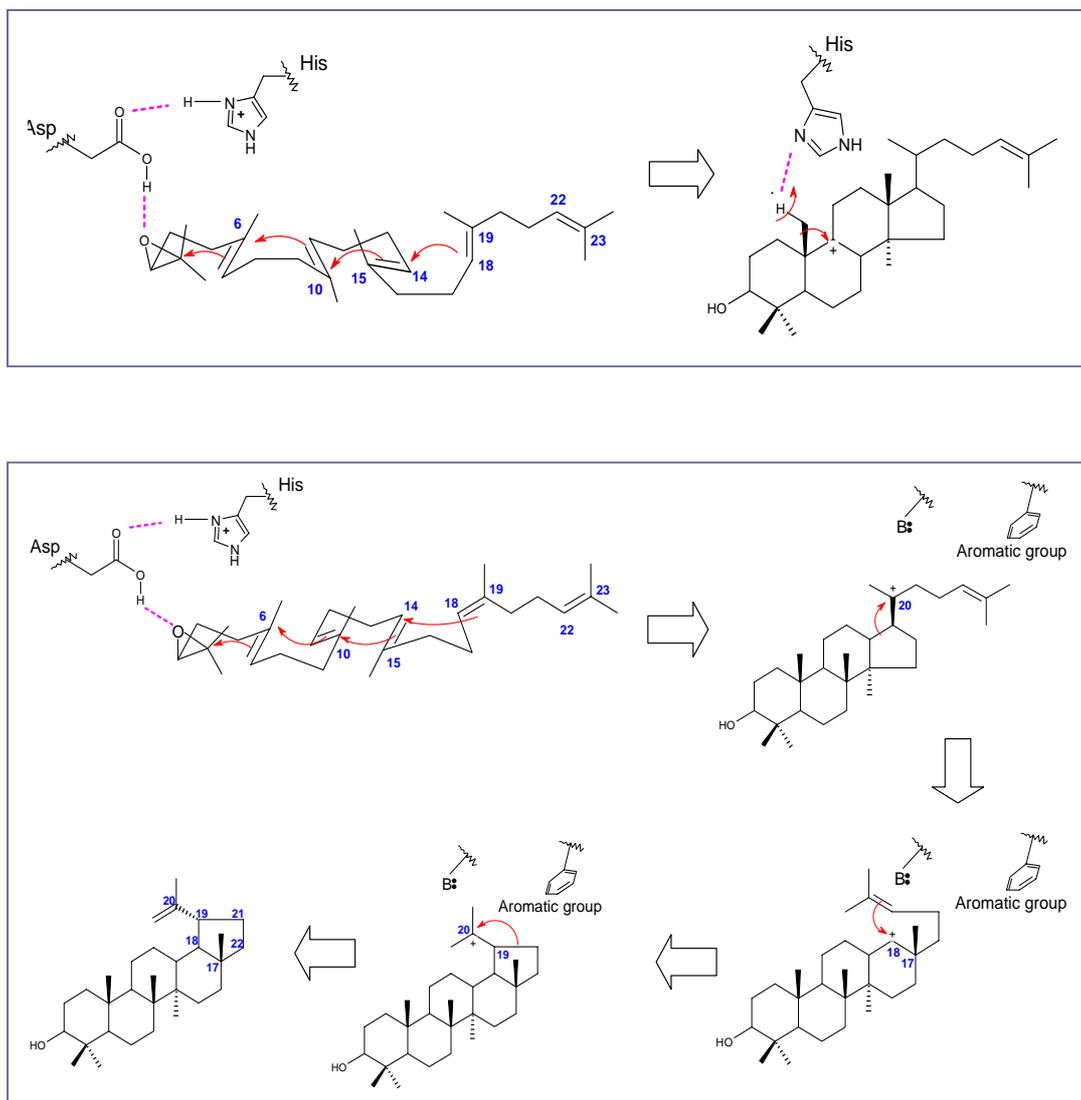


圖 1-4：高等植物中的 CAS 與 LUS，會催化相同受質氧化鯊烯，演化過程形成的活性區胺基酸差異，會使受質在酵素中進行不同摺疊方式，進行不同的環化過程而有其產物專一性。上圖為 CAS 開環活化引起環化形成的假設機制；下圖為 LUS 的推估機制，兩者因活性區上胺基酸的差異，環化生成各自專一的產物<sup>[12]</sup>

### 1-3 氧化鯊烯環化酵素家族的簡介

氧化鯊烯環化酵素是指真核生物中轉化氧化鯊烯(Oxidosqualene; OS)生成下游的代謝前驅物，如:固醇類、膜組成物、固醇類激素或其他二級代謝物。這些氧化鯊烯環化酵素會催化氧化鯊烯進行複雜的生物轉換反應，屬於自然界三萜類環化酵素家族的一類，主要利用 OS 做為反應受質。其下包含許多環化酵素，如:氧化鯊烯-羊毛硬脂醇環化酵素(OSC)、氧化鯊烯-環阿屯醇環化酵素(CAS)、羽扇醇合成酵素(LUS)、香桂素合成酵素(AMS)...等。

氧化鯊烯環化酵素的研究已持續了數十年。Robinson 發現酵素必須將受質的碳原子折疊在膽固醇的相似位置才可進行催化反應<sup>[22]</sup>。而 Bloch 與 Cornforth 利用混入實驗(incorporation)直接證明羊毛硬脂醇合成的反應機制中，酵素內有催化甲基與氫化基的轉移的重組反應<sup>[23]</sup>。Corey 與 Bloch 證明了哺乳類中氧化鯊烯環化酵素合成羊毛硬脂醇的反應受質是 2,3-氧化鯊烯而不是鯊烯<sup>[24]</sup>。Barton 更進一步證明真核生物是利用 3(S)-2,3-氧化鯊烯做為環化的反應受質，而非 3(R)-鏡像異構物<sup>[23, 25, 26]</sup>。Robustell 也利用受質類似物進行氧化鯊烯環化酵素生物轉化的機制研究，以不同位置取代基的受質類似物，驗證酵素上鄰近基團的功用<sup>[26, 27]</sup>。Corey 藉由合成氧化鯊烯環化酵素所催化生成的可能中間物，探討此單一步驟高效率的將不具立體中心的氧化鯊烯環化生成具多個不對稱立體中心的反應機制<sup>[28]</sup>。而 Ruzicka 與其研究團隊，也利用生命期短、離子性的中間物，建構出立體化學的假說<sup>[29]</sup>。Corey 和 Matsuda 也以實驗證明 Epoxide 親電性活化開環，需要酸性基團作為質子供應者誘導 Epoxide 活化開環<sup>[30, 31]</sup>。研究發現 OS 置於中性及弱酸溶液中在室溫可穩定存放一天，因此強酸被認為是開環的起始反應所必需的<sup>[29]</sup>。同時 Asp 在其它突變實驗也被驗證為高度保

留且為催化所必需的基團<sup>[32]</sup>。故此，Asp 被認為作為質子供應者誘導 Epoxide 開環，繼而進行環化反應。而氧化鯊烯環化酵素依各物種酵素上的差異而有不同的摺疊機制及產物骨架的複雜性。

由先前研究的驗證，對氧化鯊烯環化酵素的機制有一概略的了解，此類酵素具有鏡像及立體化學專一性的特性，藉單一步驟的生物轉化反應，可生成具十幾個立體中心的化合物。其酵素的環化反應先經酵素上酸性基團誘導開環而質子化，而後經酵素上胺基酸基團電子分佈引導摺疊，進行環化、重排等反應而形成高能的碳陽離子中間物，之後經酵素-受質間質子的牽引交換，或是藉由水分子參與反應進行提供-OH 基團，或水分子做為酵素與受質間的中介者而有氫鍵效應的拉扯作用，繼而中止反應，藉脫氫作用形成雙鍵，又或被提供-OH 基團形成 diol 產物。目前有近 100 種氧化鯊烯環化酵素的產物被報導<sup>[33, 34]</sup>，這些產物廣泛的骨架差異，是經類似的催化機制，但因酵素活性區或受質結合區的差異，導致多種的環狀碳骨架的形成，經環擴張與甲基、氫化基的轉移，產生不同碳陽離子中間物，最後依不同的碳陽離子-脫除(cation-quenching)步驟中止反應。

### 1-3-1 氧化鯊烯-羊毛硬脂醇環化酵素 (OSC)

在固醇類代謝途徑中，氧化鯊烯-羊毛硬脂醇環化酵素會催化氧化鯊烯環化生成羊毛硬脂醇，繼而在真菌與動物分別代謝成其重要的生理物質-麥角固醇(Ergosterol)與膽固醇。在酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae*)中 OSC 是由 *ERG7* 基因所轉譯出來的膜蛋白，由 2196 個鹼基對轉譯成 731 個胺基酸序列，蛋白質分子量為 83.7KD。由於此環化酵素分子量大、會與膜結合的特性，使得酵素純化不易，故此多年來對結構與功能機制上的探討，所知仍有限。因此，對 OSC 環化反應機制的研究，主要是利用分生技術及反應受質類似物進行探討。先前對羊毛硬脂醇生合成的環化反應研究，通常會透過下述 3 種方式探討：(1)羊毛硬脂醇合成酵素藉由受質氧化鯊烯的結構類似物進行作用的研究。(2)對不同物種的羊毛硬脂醇合成酵素做蛋白質序列比對及基因選殖，得到一些結構上的資訊，及序列結構與機制上的相關性。(3)以定點突變的酵素活性研究，判斷酵素上一些胺基酸基團在環化機制上的重要性。

針對 OSC 受質專一性和反應的立體化學特性，在 1987 年 Johnson 提出了一個理論模組(Johnson Model)(圖 1-5)，認為環化反應藉由反應活性區域上的酸性殘基(acidic residue)對(3Z)-2,3-氧化鯊烯的環氧基(epoxide)或是鯊烯的雙鍵提供質子，促使起始反應，隨後進行碳陽離子-烯烴多環環化作用(cation-olefin polycyclization)。受質之立體化學上，酵素利用具相位選擇性(facing selective)的負電荷，穩定過渡狀態(transition state)的正電高能量的碳陽離子。Johnson Model 提出了 OSC 以酵素活性區帶負電胺基酸穩定環化過程的高能中間物的假說<sup>[35, 36]</sup>。在 1992 年 Griffin 也提出了一個 Aromatic Hypothesis 理論模組<sup>[37]</sup>(圖 1-6)，由於在 OSC 中 Tyr、Trp、Phe 是具高度保留性的胺基酸，

因此，認為這些富含電子芳香族基團，可能會利用碳陽離子- $\pi$  電子作用(cation- $\pi$  interaction)的穩定效應，引導受質折疊在適當位置，並且能穩定高能的正電過渡態中間物，使得之後的甲基、氫化基團能順利的被誘導轉移。

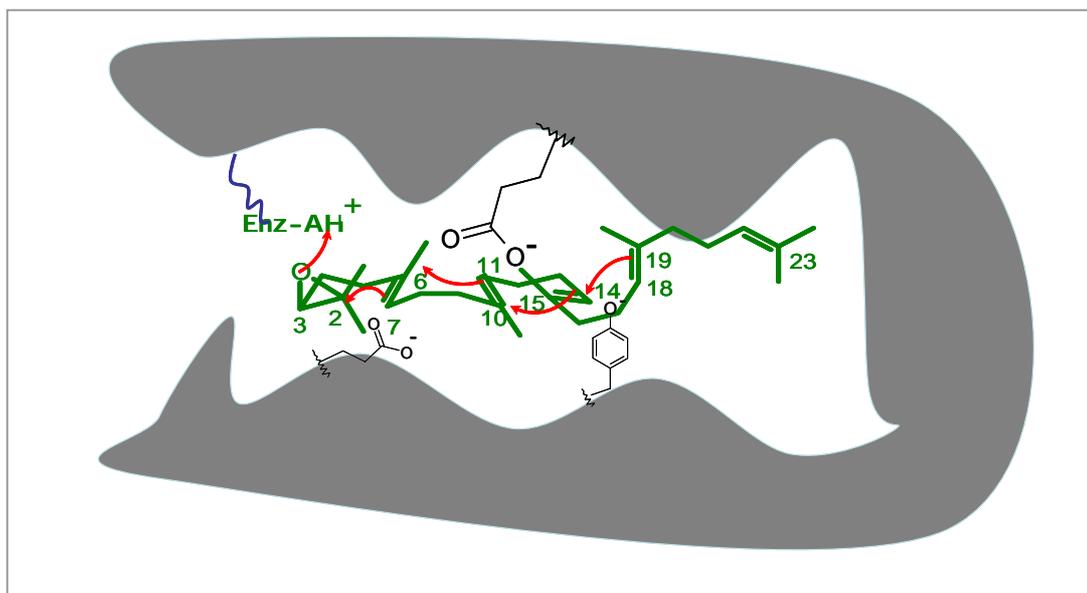


圖 1-5：Johnson Model 指出酵素活性區以帶負電胺基酸穩定高能中間物<sup>[35, 36]</sup>

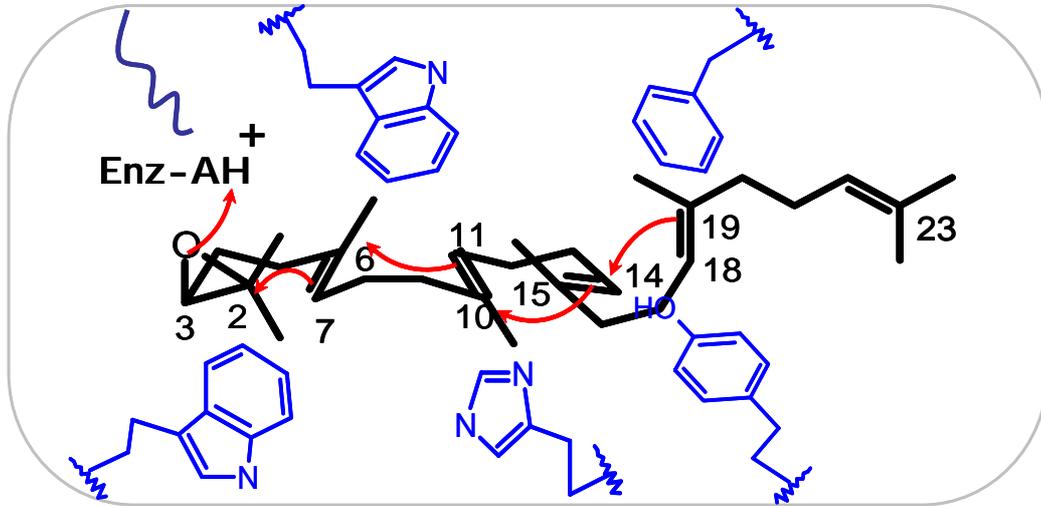


圖 1-6 : Griffin 提出 Aromatic Hypothesis 理論模組，酵素利用活性區高度保留的芳香族胺基酸基團，透過碳陽離子- $\pi$  共振作用穩定帶正電的高能產物<sup>[37]</sup>



整合先前對氧化鯊烯環化酵素催化反應的研究，可得到一些資訊：(1)原脂醇碳陽離子中間物(Protosterol cation intermediate)結構上為碳 17 $\beta$ -側鏈，顯示 OSC 催化生成羊毛硬脂醇，在碳 20 上有立體化學的控制，且碳 17 側鏈位於酵素緊密鍵結袋中<sup>[24]</sup>。(2)原脂醇碳陽離子中間物在酵素中的確是以 B 環形成船形的立體構形摺疊環化，雖然船形構形在能量上較不傾向，但可能是藉酵素反應區上胺基酸電子散布所引導生成的。<sup>[38]</sup>(3)反應受質氧化鯊烯碳 10 上所帶的甲基，對受質能否在酵素中正確摺疊有決定性的影響，且可決定碳 10、碳 11 雙鍵加成作用的正確相位選擇性(facial selectivity)<sup>[39]</sup>。(4)氧化鯊烯形成四環原脂醇碳陽離子中間物的反應過程，是先生成五碳的 C 環，之後藉 C 環的環擴張以形成六碳環後再繼續環化<sup>[31]</sup>。(5)氧化鯊烯的環

化起始，只能發生在受質有正確結合在酵素鍵結區，及有正確的摺疊引起環化形成，環化起始的 Epoxide 開環活化反應，是藉高度保留的 Asp 基團將 Epoxide 的氧質子化而引起<sup>[31]</sup>。(6)A 環的關閉與 Epoxide 鍵斷裂有協調作用。(7)原脂醇碳陽離子中間物與產物-羊毛硬脂醇之間的氫化基、甲基轉移的重組機制，是受酵素內部低活化能的熱動力學驅動，使其有最小的能量需求，而停在碳 8、碳 9 位置脫氫形成雙鍵<sup>[31]</sup>。

透過一些受質類似物與 OSC 做親和性標定(Affinity labeling)、定點突變及一些由受質類似物推測反應機制的實驗<sup>[40]</sup>，酵母菌 OSC 的 His146、Trp232、His234、Asp456 被認為是催化機制上所必需的<sup>[41]</sup>。這些研究提出了一個假設模組(圖 1-7)，認為 Asp456 及 His146 與酵素催化 Epoxide 開環引起環化起始的反應有關，推測 His146 藉氫鍵拉扯效應增強 Asp456 的酸性，使其做為質子供應者促使 Epoxide 質子化而開環。Trp232 與 H234 被認為可能位於受質接觸區域，利用富含電子的側鏈穩定原脂醇碳陽離子中間物<sup>[41]</sup>。

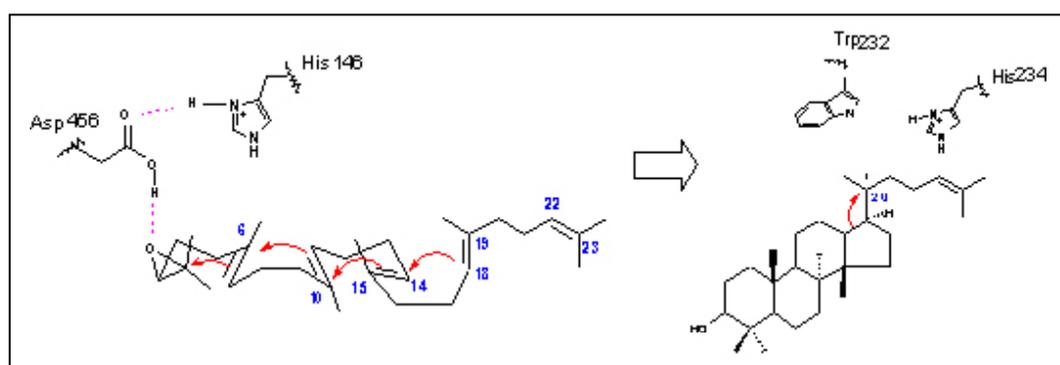


圖 1-7：酵素催化環氧化物開環及環化起始的假設模組<sup>[41]</sup>

利用序列比對針對物種高度保留的位置進行定點突變及導向演化的實驗中發現，CAS 的 Ile481 位置<sup>[42]</sup>，在不同物種的 *CAS1* 基因均為 Ile，對應於不同物種間的 *ERG7* 基因均為 Val，而 CAS 的 Tyr410 位置也有相同情況，在不同物種的 *ERG7* 基因均為 Thr。在 CAS 定點突變的研究發現，對這些高度保留位置突變成 *ERG7* 的胺基酸，產物會由正常的環阿屯醇變為羊毛硬脂醇。而 CAS Ile481 及 Tyr410 以序列比對之後，對應於 OSC 為 Val454 及 Thr384(圖 1-8)，因此，一些定點突變實驗被用以探討 OSC Val454 及 Thr384 位置所參與的催化反應(表 1-1)。這些研究認為 Val454 涉及 B 環的形成，而與脫氫的中止反應有關<sup>[42, 43]</sup>(圖 1-9)。

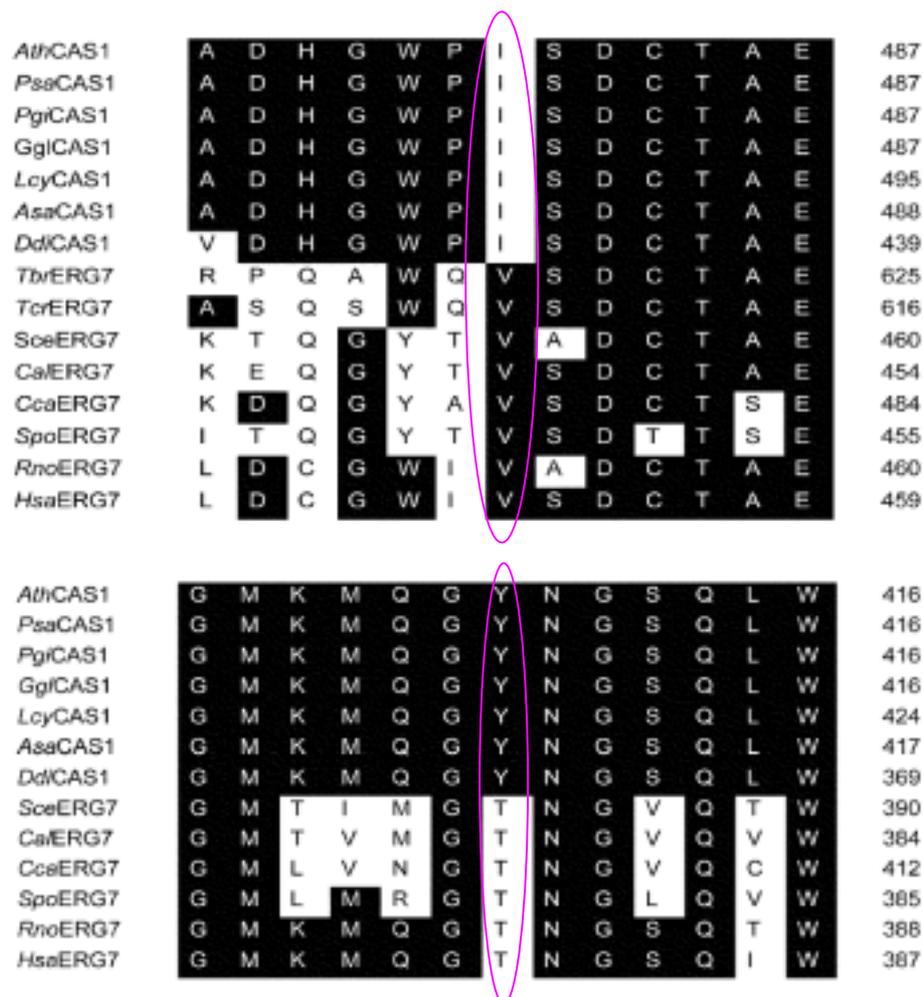


圖 1-8 不同物種 *CAS1* 基因與不同物種 *ERG7* 基因高度保留胺基酸<sup>[41]</sup>

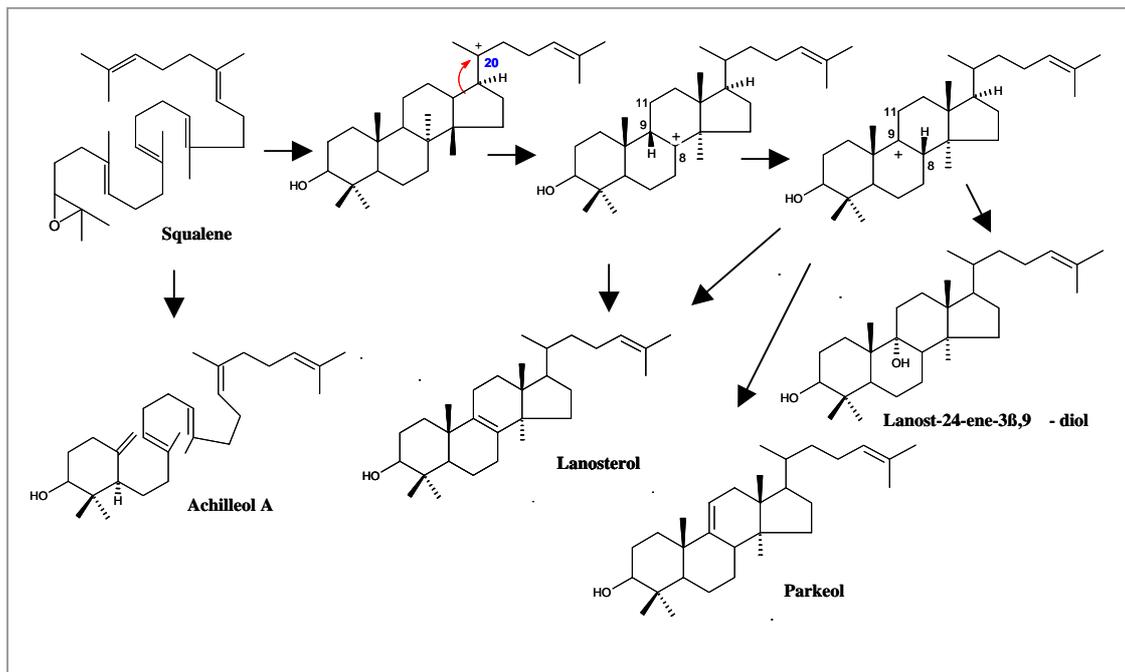


圖 1-9：酵母菌(*S.c*) OSC<sup>Val454</sup>突變株可能進行的環化過程<sup>[43, 44]</sup>



酵母菌( <i>S.c</i> ) OSC 突變株	Lanostrol %	Parkeol %	Lanost-24-ene -3β,9α-diol %	Achilleol A %
OSC <sup>V454A</sup>	95	--	--	5
OSC <sup>V454G</sup>	83	--	--	17
OSC <sup>V454L</sup>	100	--	--	--
OSC <sup>V454I</sup>	100	--	--	--
OSC <sup>T384Y</sup>	79	11	10	--
OSC <sup>T384Y V454L</sup>	20	60	20	--
OSC <sup>T384Y V454I</sup>	13	64	23	--

表 1-1：酵母菌(*S.c*) OSC<sup>Val454</sup>突變株產物<sup>[43, 44]</sup>

人類的氧化鯊烯-羊毛硬脂醇環化酵素之 X-ray 晶體結構、酵素的活性區域及活性區胺基酸基團可能參與的反應機制，目前已在 2004 年 Nature 期刊被正式發表了<sup>[45]</sup>。此 OSC 結構(圖 1-10)的確定，有助於提供不同物種的環化酵素的基本模板的依據，並在結構與反應機制上提供相關的訊息。

從人類 OSC 的 X-ray 晶體結構可發現，此酵素插入膜的部分有一直徑 25Å 的通道，形成酵素活性位置的結合凹槽。這個通道被認為允許反應受質-氧化鯊烯進入疏水性的活性區域，且會對於此活性區域會有分隔作用使受質的出入口被壓縮封起。受質的通道會藉 OSC 的 Tyr237、Cys233 及 Ile524 這些胺基酸側鏈構形的改變，或是藉被扭曲拉緊的環狀區段 516~524 及 697~699 的重排作用而被完成<sup>[46]</sup>(圖 1-11)。

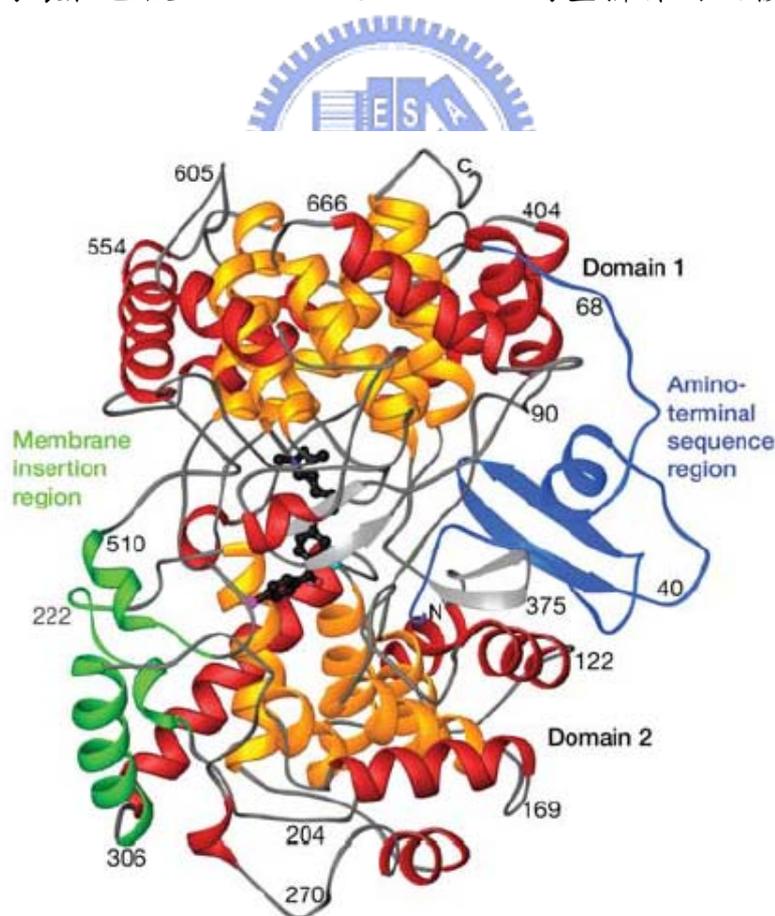


圖 1-10：人類 OSC X-ray 晶體結構，圖中黑色部分為與抑制劑結合，指出受質結合的反應活性位置<sup>[45]</sup>

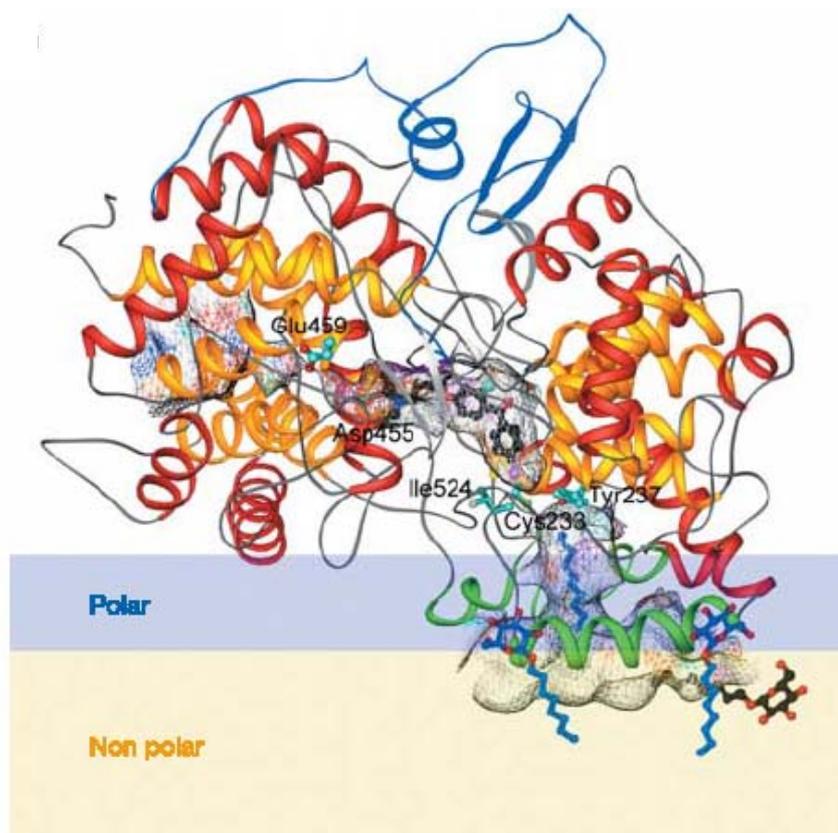


圖 1-11：人類 OSC 與膜結合時的構形，圖中黑色部分為抑制劑 Ro 48-8071 結合在中心反應活性結合區，藉此表示催化時反應物與酵素活性區胺基酸的相關位置<sup>[45]</sup>

同屬於三萜類環化家族的 SHC 常被用以做為了解 OSC 環化機制的結構模組，但此同源性結構模組有其限制性。SHC 是利用演化程度較早的鯊烯為受質，藉由組織胺酸(Histidine)的殘基增強酸活化打開雙鍵的起始環化作用，在 B 環為椅形的構形，且藉著 SHC Trp169 的作用，利用碳陽離子- $\pi$  電子共振的穩定效應，引起 D 環擴張，繼而引導 E 環環化而形成五環的蛇麻烯(Hopene)<sup>[47]</sup>。先前許多關於 OSC 環化機制的探討，証實 OSC 是利用氧化鯊烯為受質，B 環是以能量

較不傾向的船形構形摺疊，環化反應中止在 D 環<sup>[48]</sup>。OSC 與 SHC 的環化反應在機制上有明顯的差異性，故此，利用人類 OSC 的 X-ray 晶體結構，對此高度立體選擇性的環化機制，會有較清楚的論點<sup>[45]</sup>。

先前一些實驗及研究已經證明 OSC 催化氧化鯊烯一步環化生成四環的羊毛硬脂醇，是透過活性區上的 Asp455 酸催化開環，使 Epoxide 的氧被質子化而有環化起始反應，同時也建構了酵素中催化環化反應過程<sup>[30]</sup> (圖 1-12)。

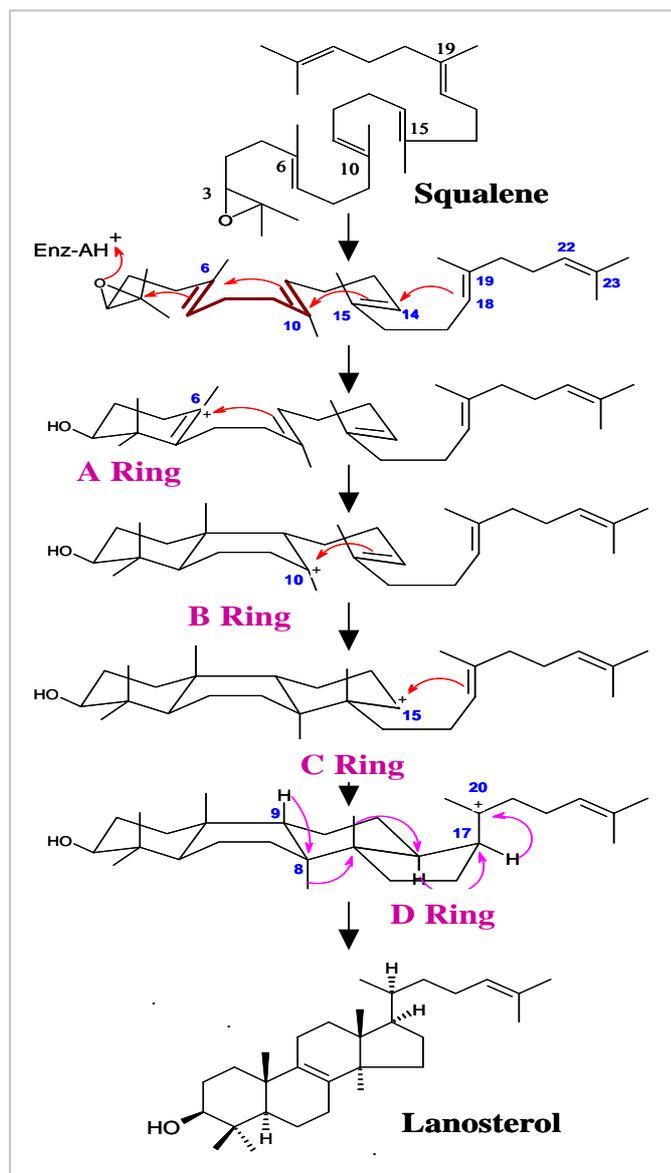


圖 1-12 :OSC 催化直鏈的氧化鯊烯環化生成四環羊毛硬脂醇的機制<sup>[30]</sup>

因此，利用人類 OSC 的 X-ray 晶體結構，可發現 OSC 是利用活性區的 Cys456 及 Cys533 與 Asp455 有氫鍵的交互作用，藉此氫鍵的拉扯效應增強 Asp455 的酸性，幫助酸誘導開環的起始環化。當一個催化循環完成，Asp455 會透過水分子及 Glu459 的羧酸基團，或是藉最後脫氫步驟的質子轉移再質子化。Trp387、Phe444、Tyr503、Trp581 的位置具保留性，會利用其側鏈富含電子的特性，透過碳陽離子- $\pi$  共振的交互作用，在適當的位置及位向來穩定 A 環形成與 B 環形成所生成的碳 6、碳 10-四級碳陽離子中間物。Tyr98 藉著推動氧化鯊烯碳 10 上的甲基至分子平面之下，可迫使 B 環有能量不傾向的船形構形的摺疊，也就是透過其立體空間大的側鏈，阻礙 B 環形成能量較傾向的椅形構形<sup>[45]</sup> (圖 1-13)。

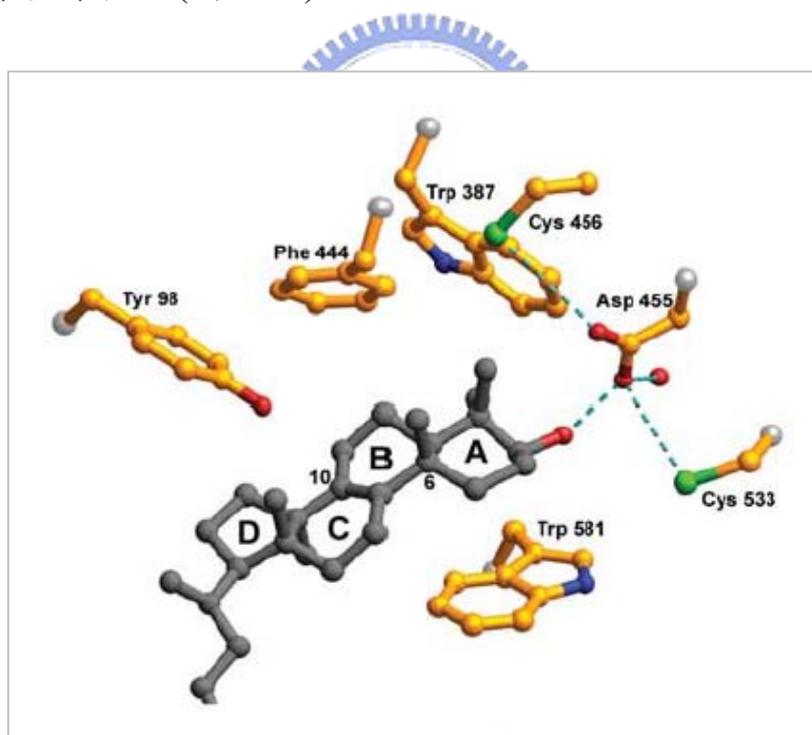


圖 1-13 : Asp455 與 Cys456 及 Cys533 的氫鍵拉扯效應幫助 Epoxide 誘導開環; Trp387、Phe444、Trp581 穩定 A 環形成與 B 環形成的碳 6、碳 10-碳陽離子中間物; Tyr98 的側鏈對 B 環形成能量較傾向的椅形構形有立體阻礙<sup>[45]</sup>

His232 與 Phe696 藉由側鏈基團富含電子的  $\pi$  電子交互作用，穩定 C 環形成時，依反-馬可尼可夫(anti- Markovnikov)機制形成的二級碳陽離子。且可藉碳陽離子- $\pi$  電子共振的交互作用，穩定碳 20-碳陽離子的正電。His232 對碳 8/碳 9-碳陽離子是最靠近的鹼基團，因此能協助碳 8/碳 9 的脫氫反應。OSC 一連串的環化步驟會中止在五個碳的 D 環所形成的碳 20-四級原脂醇碳陽離子，因為 OSC 缺乏像 SHC 的 Trp169 芳香族官能基，SHC 藉著 Trp169 的  $\pi$  電子，穩定碳 17-二級碳陽離子中間物，使其有較長的生命期而更進一步的環化形成 E 環。碳 20-碳陽離子中間物藉著骨架重排被轉換生成碳 8/碳 9-碳陽離子，這些碳陽離子的轉移，是因為酵素活性區在碳 8/碳 9 附近有 7 個芳香族胺基酸基團--Trp192、Trp230、His232、Tyr237 Tyr503、Phe521、Phe696，這些在碳 8/碳 9 附近的高密度  $\pi$  電子，促使碳陽離子中間物骨架的重排(圖 1-14)。高度保留的 His232，其鹼性殘基靠近碳 8/碳 9-碳陽離子，能夠接受質子而催化環化反應中最後的專一性脫氫作用。而 Tyr503 側鏈上的-OH 基團，會與 His232 有氫鍵交互作用的拉扯效應，使得 His232 能有最適當的位置，催化最後的脫氫作用而中止反應，且 His232 也許會透過鄰近的水分子的交互作用，影響催化反應的進行<sup>[45]</sup> (圖 1-15)。

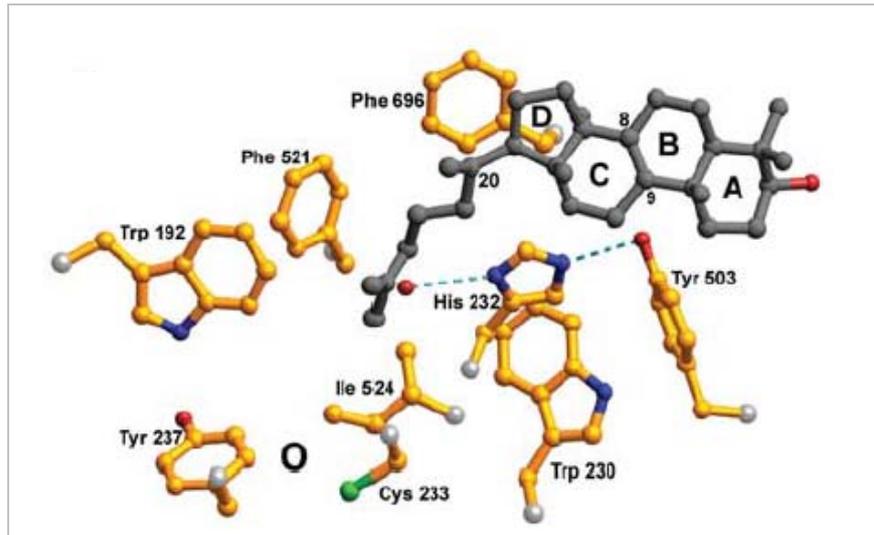


圖 1-14：酵素活性區在碳 8/碳 9 附近有 7 個芳香族胺基酸基團 --Trp192、Trp230、His232、Tyr237 Tyr503、Phe521、Phe696，His232 與 Tyr503 有氫鍵拉扯效應，使得 His232 能有最適當的位置，催化最後的脫氫作用而中止反應，且 His232 會透過和水分子的交互作用，影響催化反應<sup>[45]</sup>。

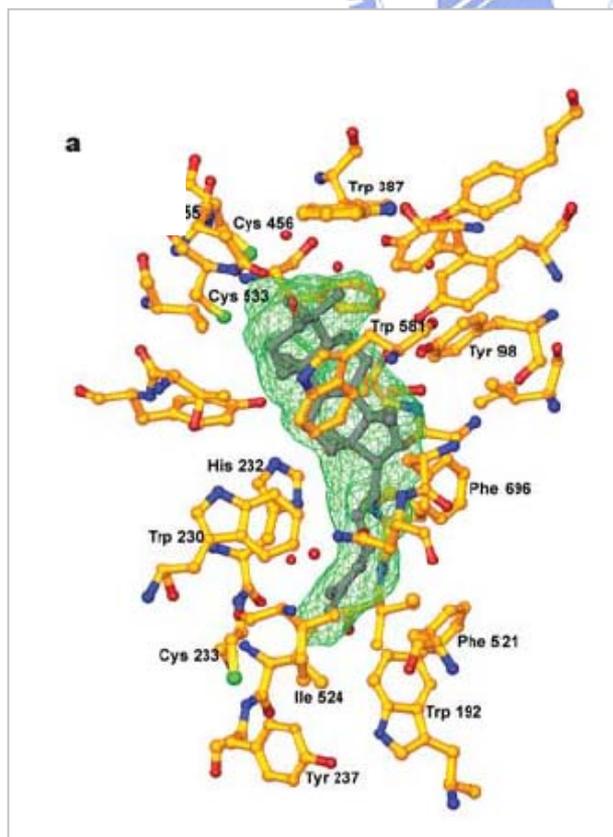


圖 1-15：氧化鯊烯環化酵素與其產物-羊毛硬脂醇形成複合物的結構圖。圖中所顯示的胺基酸基團為距離產物小於 5Å 的位置，水分子只有在 Asp455 及 His232 附近有被觀察到<sup>[45]</sup>

## 1-3-2 氧化鯊烯-環阿屯醇環化酵素 (CAS)

氧化鯊烯-環阿屯醇環化酵素在脂醇生合成的途徑中，催化氧化鯊烯環化生成植物固醇的前驅物—環阿屯醇(Cycloartenol)，繼而代謝合成植物固醇(Phytosterol)。在阿拉伯芥(*Arabidopsis thaliana*) 的環阿屯醇環化酵素(CAS, EC 5.4.99.8)，由 759 個胺基酸所組成，分子量為 86 kDa。

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)在環化的機制上有相當相似的反應過程。它們同樣以氧化鯊烯作為反應受質，在各自的專一性酵素中，同樣依椅形-船形-椅形的摺疊形式在酵素中進行催化，環化生成碳 20-原脂醇碳陽離子中間物，且有相同的甲基、氫化基轉移的重組機制，只有在最後的脫氫終止反應時有不同位置的脫氫作用，氧化鯊烯-環阿屯醇環化酵素(CAS)催化碳 19 上的氫脫除而生成環阿屯醇，氧化鯊烯-羊毛硬脂醇環化酵素則催化碳 8 上的氫脫除而生成羊毛硬脂醇。而利用序列比對的方式對照兩者假設的活性區位置，發覺只有少數的胺基酸基團不同，這些位置很有可能就是造成兩者在脫氫作用上不同的物種專一性反應。因此，目前很多研究就是利用序列比對不同物種的 *CAS1* 基因及 *ERG7* 基因的胺基酸序列，找出各自的高度保留性胺基酸，將其彼此做突變，希望藉此找出酵素結構上與催化機制的相關性<sup>[49, 50]</sup>。

一些探討 CAS 催化反應的研究指出<sup>[51]</sup>(表 1-2) (圖 1-18)，Ile481 及 Tyr410 在不同物種的氧化鯊烯-環阿屯醇環化酵素有高度保留性(圖 1-16)，對應於不同物種的氧化鯊烯-羊毛硬脂醇環化酵素為高度保留的 Val 及 Thr，而將氧化鯊烯-環阿屯醇環化酵素 Ile481 突變成 Val 及 Tyr410 突變成 Thr，產物會有羊毛硬脂醇生成，顯示透過突變效應，氧化鯊烯-環阿屯醇環化酵素具有氧化鯊烯-羊毛硬脂醇環化酵素

的功能，而在 CAS H477 突變點<sup>[52]</sup>，也可發現有導向演化的結果出現 (圖 1-17)。

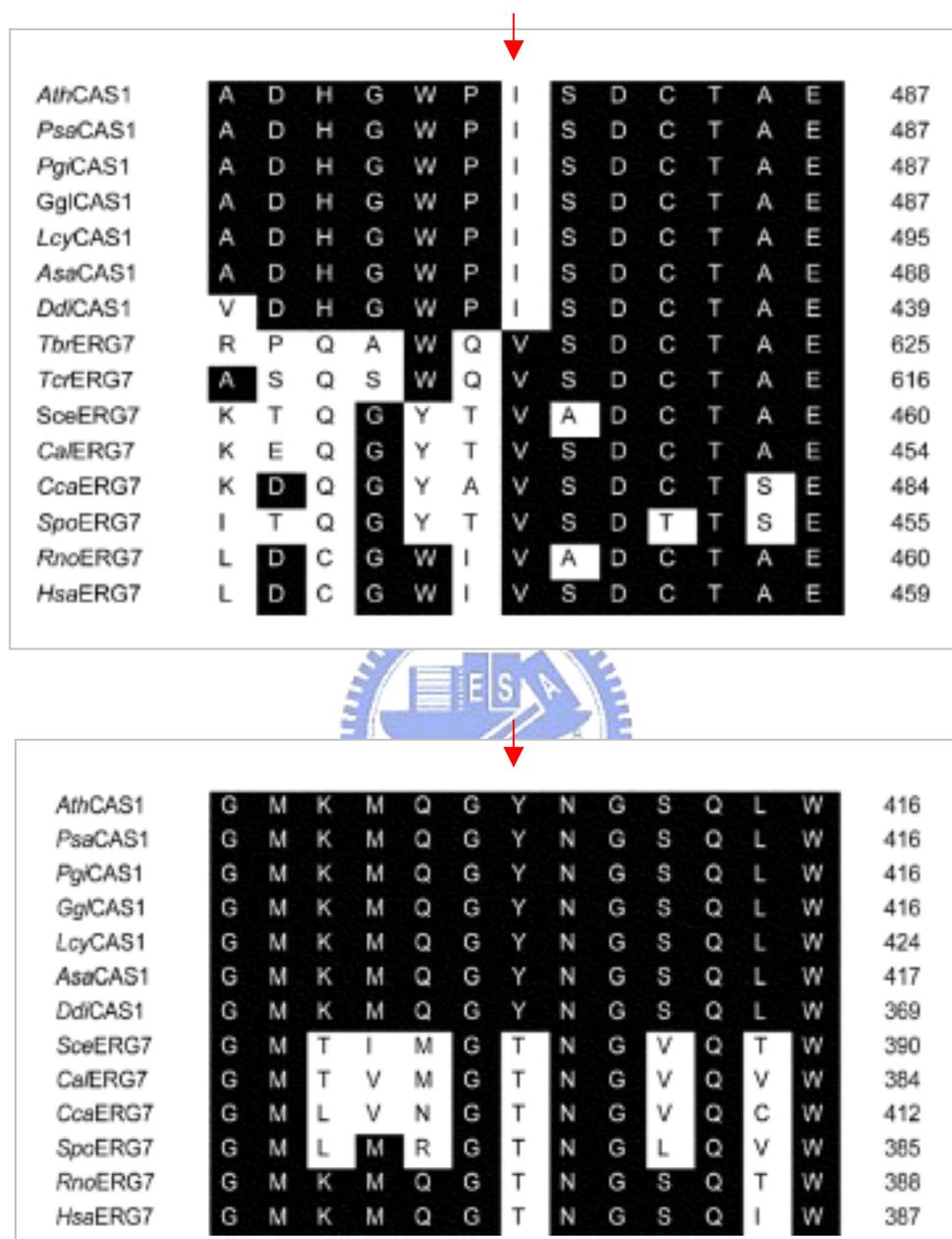


圖 1-16：紅色箭頭所指為不同物種的氧化鯊烯-羊毛硬脂醇環化酵素及氧化鯊烯-環阿屯醇環化酵素具有高度保留性，此可能是催化差異的重要位置<sup>[51]</sup>

<i>AthCAS1</i>	P	F	S	T	A	D	H	G	W	P	I	S	D	483
<i>PsdCAS1</i>	P	F	S	T	A	D	H	G	W	P	I	S	D	483
<i>PglCAS1</i>	P	F	S	T	A	D	H	G	W	P	I	S	D	483
<i>GglCAS1</i>	P	F	S	T	A	D	H	G	W	P	I	S	D	483
<i>LcyCAS1</i>	P	F	S	T	A	D	H	G	W	P	I	S	D	491
<i>AsoCAS1</i>	P	F	S	T	A	D	H	G	W	P	I	S	D	484
<i>DdiCAS1</i>	P	F	S	T	V	D	H	G	W	P	I	S	D	435
<i>TbrERG7</i>	N	F	S	T	R	P	Q	A	W	Q	V	S	D	621
<i>TcrERG7</i>	N	F	S	T	A	S	Q	S	W	Q	V	S	D	612
<i>SceERG7</i>	G	F	S	T	K	T	Q	G	Y	T	V	A	D	456
<i>CalERG7</i>	P	F	S	T	K	E	Q	G	Y	T	V	S	D	450
<i>CcoERG7</i>	P	F	S	N	K	D	Q	G	Y	A	V	S	D	480
<i>SpoERG7</i>	P	F	S	N	I	T	Q	G	Y	T	V	S	D	451
<i>RnoERG7</i>	P	F	S	T	L	D	C	G	W	I	V	A	D	456
<i>HsoERG7</i>	S	F	S	T	L	D	C	G	W	I	V	S	D	455

圖 1-17：不同物種的氧化鯊烯-環阿屯醇環化酵素在阿拉伯芥 CAS H477 有高度保留性，但在氧化鯊烯-羊毛硬脂醇環化酵素有些為 Gln，有些為 Cys<sup>[52]</sup>

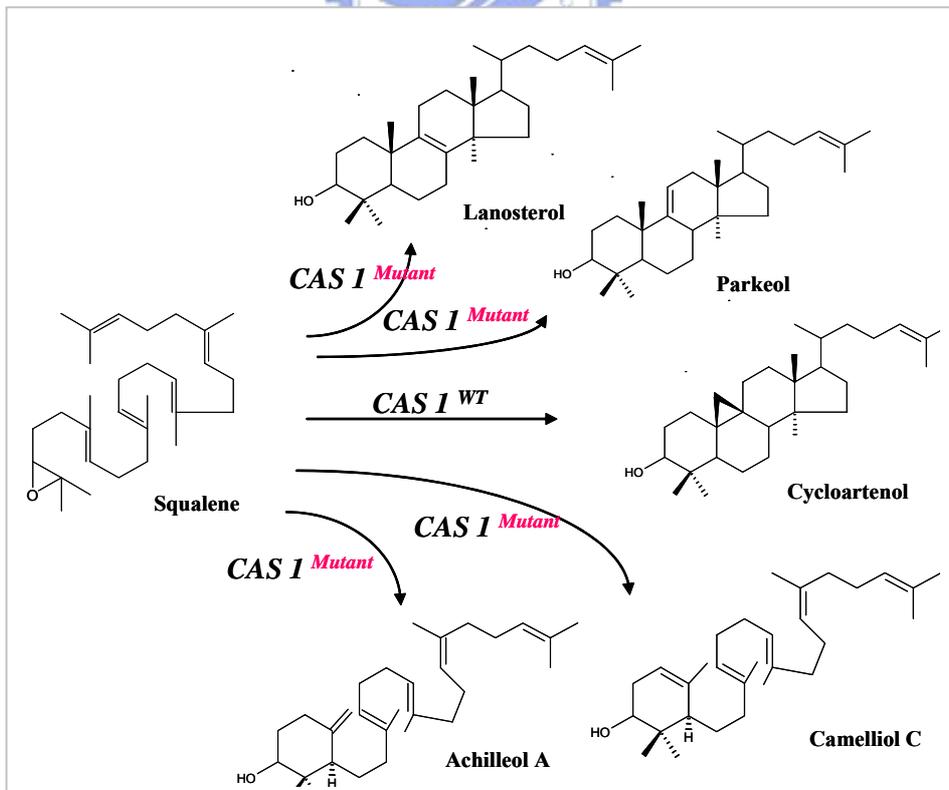


圖 1-18：阿拉伯芥 CAS 正常途徑合成的產物及突變點生成的產物

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

表 1-2：目前阿拉伯芥 CAS 已被報導的定點突變產物及比例分布<sup>[52]</sup>

統整這些突變點的研究結果而有一些論述。Ile481 位於活性區域的頂端位置，非常靠近已被公認的受質鍵結區域上，與環化反應之去質子作用有關，影響 A 環形成，當 Ile 突變成立體空間障礙較小的 Val，在空間上與羊毛硬脂醇合成酶素有相似的位置，會改變原先在碳 19 的脫氫作用<sup>[53]</sup>。

CAS Tyr410 與 His257 有氫鍵配對的交互作用，其靠近在碳 19 的位置，協助碳 19 上的氫脫除反應而形成一個碳 19 的三角環生成。Tyr410 可能屬於保留序列區域，且位於分子模擬活性區域表面的另一面，對於形成 Dammarenyl Cation 中間產物極為重要<sup>[54]</sup>。在胺基酸序列上 Tyr410 的前一個胺基酸為甘胺酸 (Glycine)，後一個胺基酸為天門冬醯胺 (Asparagine)，Gly-Tyr-Asn Motif 活性功能區在酶素催化過程中扮演重要的角色。當 Tyr410 突變成半胱胺酸 (Cysteine)，突變株 CAS<sup>Tyr410Cys</sup> 失去 CAS 活性使得產物由環阿屯醇轉變為 75 % 羊毛硬脂醇、24 % 9 $\beta$ -lanosta-7, 24-dien-3 $\beta$ -ol 以及 1% Achilleol A。半胱胺酸在空間上與電子的分佈上與酰胺酸相似，這樣的性質對於動物及真菌的羊毛硬脂醇的生成極為重要<sup>[54]</sup>。

而 His257 與 Asp483 被認為是 CAS 催化活性上所必須的，Asp483 被認為<sup>[52]</sup>作為 Lewis acid 幫助 Epoxide 開環，協助環化的起始作用。His257 被認為是作為活性區域的鹼基團，協助碳 19 上的氫與活性區上的酸基有一質子的來回移動，幫助碳 19 的脫氫作用。

CAS His477 雖不位於受質鍵結的活性區域，但在利用電腦模擬探討雙點突變空間上的結構相關性，認為 His477 位於活性區域外面的 N 端附近，在空間中相當接近受質鍵結區域，與 Tyr410 有氫鍵的交互作用，藉著對 Tyr410 的氫鍵拉扯效應，影響環化機制終止反應前的脫氫作用，因而會生成羊毛硬脂醇，造成一導向演化的結果<sup>[51]</sup>。

### 1-3-3 鯊烯-蛇麻烯環化酵素 (SHC)

細菌的鯊烯環化酶(SHC)與 OSC、CAS 同屬於自然界中的三萜類環化酵素家族，SHC 與真核生物之 OSC 有類似的反應機制(圖 1-19)。與真核的氧化鯊烯環化酵素比較，細菌的鯊烯環化酵素以鯊烯為反應受質，被認為是在演化的過程中出現在較早的厭氧時期。真核細胞以有氧參與的氧化鯊烯反應生成具高度立體選擇性的環狀產物。因此，只有在演化出現光合作用的生命體後才能發展出將鯊烯環氧化成為氧化鯊烯的過程。此外，鯊烯環化酵素在反應機構和形態上都是以較簡單的方式進行。當它進行環化作用時是以”椅形-椅形-椅形”的構形存在，而有能量上的趨向性使其所需較小的酵素助力。細菌的鯊烯環化酵素具有較低的受質專一性。環化反應不但可以環化一般自然界的鯊烯受質，而且對於氧化鯊烯的光學異構物和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。

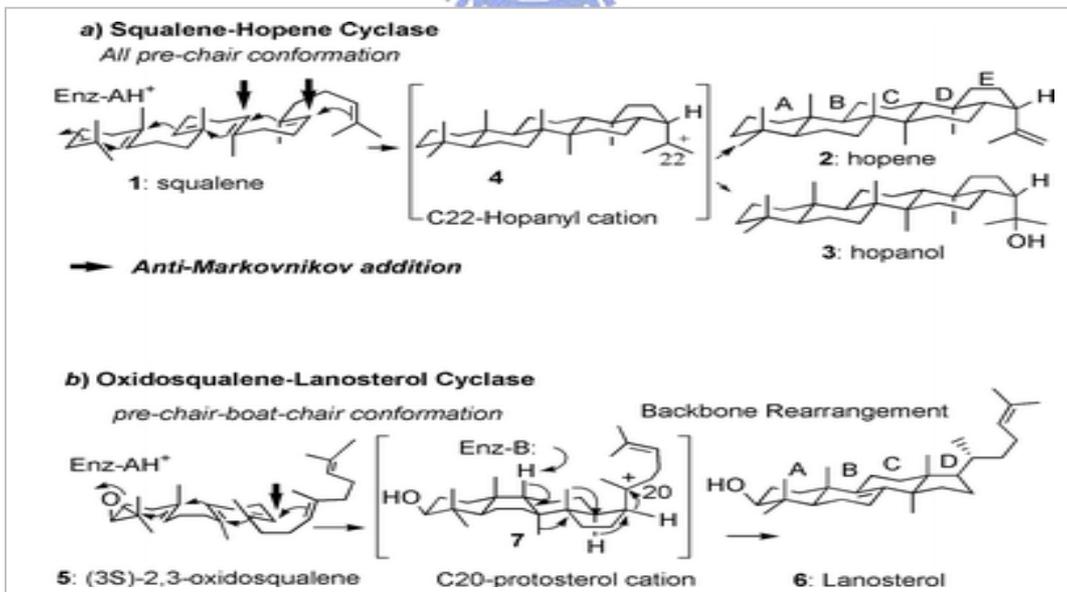


圖 1-19：同源性的鯊烯環化酵素與氧化鯊烯-羊毛硬脂醇環化酵素，在催化反應有類似的環化機制<sup>[55]</sup>

目前在 *A. acidocaldarius* 中鯊烯-蛇麻烯環化酵素(SHC, EC 5.4.99.x)，其X-ray晶體結構、酵素蛋白的活性區域與可能的反應機制，已經正式發表在 1997 年 Science 期刊<sup>[56]</sup>，這些結構的資訊，可用作其他同源性環化酵素家族的基本模板依據，並在反應機制與結構功能上提供重要之相關性(圖 1-20)。比對 *Alicyclobacillus acidocaldarius* 的 SHC 與人類的 OSC，在蛋白質重要區域的胺基酸序列有 20 % 的相同性 (Identity)，且有明顯的同源性。希望透過對 SHC 結構上的相關資訊，推估 OSC 環化過程的催化機制。

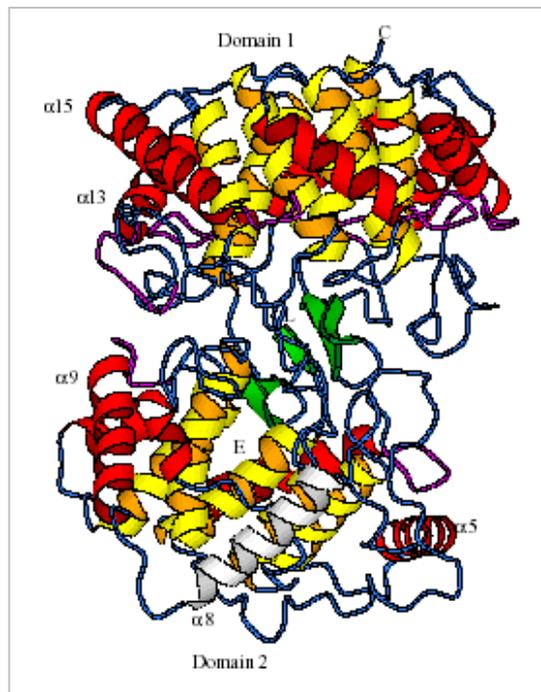


圖 1-20 : SHC 之 X-射線晶體結構圖。C：胺基酸的 COOH 端；N：NH<sub>2</sub> 端；L：抑制劑接合位置；E：酵素表面唯一的非極性區域，約 1600 Å<sup>2</sup> 為受質進入的通道 (Channel Entrance)。紅色與黃色之滾筒狀緞帶構形為 α-Helix 的結構；綠色為 β 結構；紫色為 QW-Motifs 之重複區域<sup>[56]</sup>

先前有研究利用固醇類抑制劑Ro48-8071探討*Alicyclobacillus acidocaldarius* 的SHC酵素結構與催化功能的相關性<sup>[57]</sup>。研究指出Ro48-8071在*A. acidocaldarius*的SHC之X-射線晶體結構中，與酵素蛋白相結合的活性區域位置(圖1-21)，以及藉由酵素動力學之實驗數據證明SHC與Ro48-8071間的抑制關係，繼而探討各活性區位置與催化上所參與的作用。

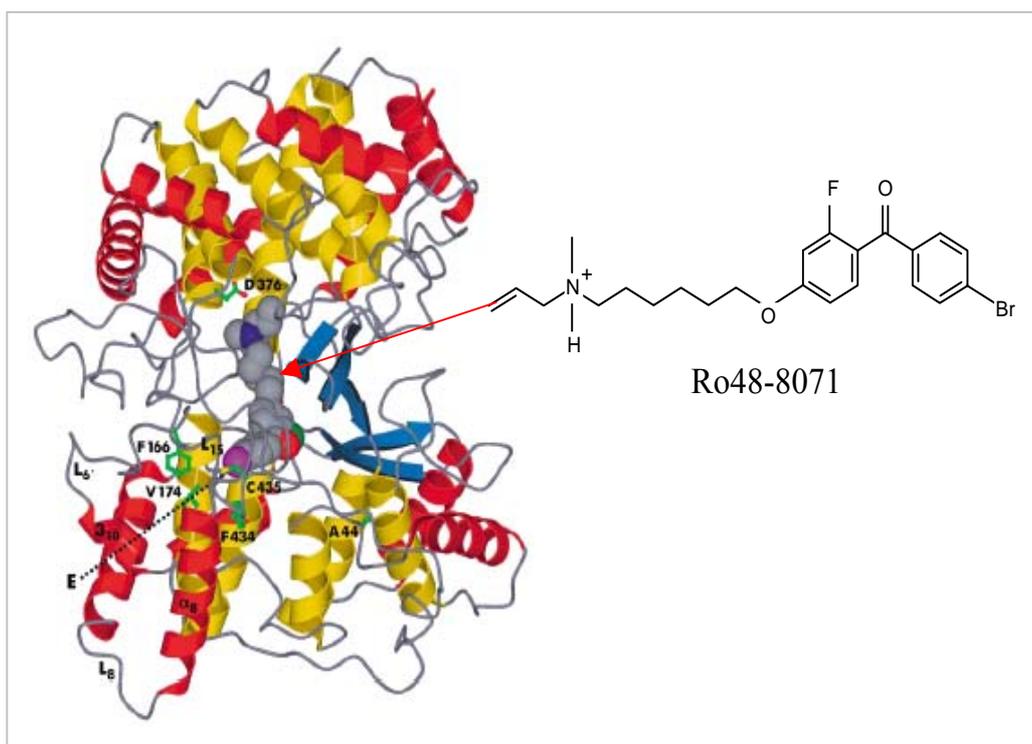


圖1-21：以OSC抑制劑說明環化起始反應。藉由目前有效的OSC抑制劑Ro48-8071(灰色)與SHC接合的分子模擬圖，證明Asp376為提供質子起始環化反應

研究指出 SHC 之蛋白質序列第 374 至 380 個胺基酸以及受質鍵結凹槽區之芳香族胺基酸 Trp312、Phe365、Trp489、Tyr495、Phe601、Tyr609 與 Tyr612 為保留區域<sup>[56]</sup>。在 SHC (A.c) 反應結合區域，Asp376 提供質子起始環化反應。Glu45 和 Glu95 在氫鍵牽引的拉扯效應下，利用水分子來吸引質子。His451 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協助起始環化反應。Tyr420 可能與蛇麻烯的 B 與 C 環之形成有關<sup>[56]</sup>。Trp489 在 A 環形成過程中，以胺基酸側鏈的  $\pi$  電子基團穩定 C-10 碳陽離子。Phe601 可穩定 C-18 位置之碳陽離子中間物。Asp377 和 Asp374 形成一個空間距離近的氫鍵(2.6 Å)，利用胺基酸側鏈所攜帶負電穩定鯊烯的 C-10 碳陽離子<sup>[58]</sup>。Trp312 和 Trp489 以及芳香族胺基酸 Phe365、Tyr495、Phe601、Tyr609 與 Tyr612，利用富含電子的苯環及 Indole 側鏈，經由碳陽離子- $\pi$  電子共振作用(Cation- $\pi$  interaction) 穩定碳陽離子中間物，加速環化作用，使得鯊烯能順利被催化重組<sup>[59]</sup>。突變株 SHC<sup>H451A</sup> 與 SHC<sup>W489A</sup> 無新產物之產生，但在 SHC 活性影響方面，突變的結果卻導致酵素活性下降；在突變株 SHC<sup>F601A</sup> 與 SHC<sup>Y420A</sup> 中，除了酵素活性明顯下降之外，有新產物四環的 17-Isodammara-20 和五環的 Diplopterol 生成。因此，受質鍵結區域之芳香族胺基酸不但可以穩定過渡態陽離子中間產物，也可能決定產物之生成<sup>[49]</sup>。

## 1-4 (氧化)鯊烯環化酵素之胺基酸序列比對

環化酵素家族催化具高度立體選擇性的反應，形成產物專一性，在反應機制上也有很高的平行性。一些研究指出，環化酵素家族催化的反應具有下述的特性：(1)具有特殊的蛋白質構型以利於反應受質的接合。(2)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，以及有正確的反應摺疊構形，才能催化開環而有環化起始反應發生。(3)活性區域之胺基酸有碳陽離子- $\pi$ 電子交互作用以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，確保產物順利生成<sup>[60]</sup>。

以生物演化之觀點而言，若序列彼此間皆保留相同之胺基酸，此類胺基酸可能因為在演化過程中具備重要之功能，因而在不同種類但功能相似之酵素間被保存下來，如環化酵素家族中芳香環的胺基酸；反之，序列間相異之胺基酸可能因為演化上較不重要而產生變異，或者是物種的差異而有所不同，但這些差異有可能就是不同物種之酵素間控制催化機制的關鍵處。故此，為了探求進一步的資訊，利用相似功能的同一酵素家族之胺基酸序列比對，得知彼此間的相同性、相似性，及官能基性質相近之胺基酸在比對序列時會排列於相對應之位置上，用來探討酵素結構上與功能的相關性。

利用 Clustal W 系統將存於 National Center For Biotechnology Information (NCBI) 基因庫中之環化酵素家族的蛋白質序列：*A. acidocaldarius* 的 SHC、阿拉伯芥 (*A. Thaliana*) 之 CAS 與酵母菌 (*S. cerevisiae*) 之 OSC、牛肝(Bovine liver) 之 OSC 及人類(*H. sapiens*) 之 OSC，進行序列比對，將環化家族內蛋白質序列結果做分析(圖 1-22)。

	1		50
<i>H. sapienes</i> OSC	MTEGTCLRRRGGPYKTEPATDLGR--WRLNCERGR-----QTWTYLQDERAGREQTG		50
<i>B. Liver</i> OSC	MTEGTCLRRRGGPYKTEPATLSR--WRLSNQVGR-----QTWTYSQEEDPVREQSG		50
<i>A. thaliana</i> CAS	-MWKLKIAEGGSPWLRRTTNHVGQRQFWEFDPNLGTPEDLAAVEEARKSFSDNRFVQKHSA		59
<i>S. cerevisiae</i> OSC	-MTEFYSDTIG---LPKTDPRLWR---LRTDELGR-----ESWEYLTPQQAANDPPS		45
<i>A. acidocaldarius</i> SHC	-----MAEQLVEAP--		9

<i>H. sapienes</i> OSC	LEAYALGLDTKNYFKDLP-----KAHTAFEGALN-GMTFYVGLQAED-GHWTGDY	98
<i>B. Liver</i> OSC	LEAHLGLDTKSFFKDLP-----KAHTACRGALN-GVTFYAALQTED-GHWAGDY	98
<i>A. thaliana</i> CAS	DLLMRLQFSRENLSPLVPQVKIEDTDDVTEEMVETTLKRGLDFYSTIQAHD-GHWPGDY	118
<i>S. cerevisiae</i> OSC	TFTQWLLQDPK-FPQPHPERNK---HSPDFSAFDACHN-GASFFKLLQEPDSGIFPCQY	99
<i>A. acidocaldarius</i> SHC	-----AYARTLDRAVEYLLSCQKDE-GYWWGPL	36

Phe104T

His146A

<i>H. sapienes</i> OSC	GGPLFLLPGLLITCHVA---RIPLPAGYREEIVRYLRSVQLP-DGGWGLHIEDKSTVFGT	154
<i>B. Liver</i> OSC	GGPLFLLPGLLITCHVA---NIPLPAGYREEIRYLRVSVQLP-DGGWGLHIEDKSTVFGT	154
<i>A. thaliana</i> CAS	GGPMFLLPGLITLSTIGALNTVLSEQHKQEMRRYLYNHQNE-DGGWGLHIEGPSTMFSG	177
<i>S. cerevisiae</i> OSC	KGPMFMTIGYVAVNYIAG---IEIPEHERIELIRYIVNTAHPVDGGWGLHSVDKSTVFGT	156
<i>A. acidocaldarius</i> SHC	LSNVTMEAEYVLLCHILD---RVDRDRMEKIRRYLLHEQRE-DGTWALYPGGPPDLDTT	91

<i>H. sapienes</i> OSC	ALNYVSLRILGVGPDDPD--LVRARNILHKKGGAVAPSWGKFWLAVLNVSWEGLNTLF	212
<i>B. Liver</i> OSC	ALNYVSLRILGVGPDDPD--LVRARNLLHKKGGAVFIPSWGKFWLAVLNVSWEGLNTLF	212
<i>A. thaliana</i> CAS	VLNYVTLRLLGEGPNDGDGDMEKGRDWILNHGGATNITSWGKMWLSVLGAFESGNPLP	237
<i>S. cerevisiae</i> OSC	VLNYVILRLLGLPKDHPV--CAKARSTLLRLGGAIGSPHWGKIWLSALNLYKWEVNPAP	214
<i>A. acidocaldarius</i> SHC	IEAYVALKYIGMSRDEEP--MQKALRFIQSQGGIESSRVFTRMMLALVGEYPWEKVPMPV	149

### Trp232A/R

<i>H. sapienes</i> OSC	PEMWLFPDWAPAH PSTLWCHCRQVYLPMSYCYAVRLSAAEDPLVQSLRQELYVEDFASID 272
<i>B. Liver</i> OSC	PEMWLFPDWMPAH PSTI WCHCRQVYLP MAYCYSTRLSAEEGPLVQSLRQELYLEDYSCID 272
<i>A. thaliana</i> CAS	PEIWLLPYFLPIHPGRMWCHCRMVYLPMSYLYGKRFVGPITSTVLSLRKELFTVPYHEVN 297
<i>S. cerevisiae</i> OSC	PETWLLPYSLPMHPGRWVHTRGVYIPVSYLSLVKFSCPMTPLLEELRNEYTKPFDKIN 274
<i>A. acidocaldarius</i> SHC	PEIMFLGKRMP LNIYEFGSWARATVVALSIVMSRQPVFPLPERARVP--ELYETDVPPRR 207

### His234A

<i>H. sapienes</i> OSC	WLAQRNNVAPDELYTPHSWLLRVVYALLN-----LYEHHS-AHLRQRAVQKLYEHI VAD 326
<i>B. Liver</i> OSC	WAAHRNSVAPDDLYTPHSWLLHVVYAILN-----LYERHS-TSLRQWATQKLYEHI AAD 326
<i>A. thaliana</i> CAS	WNEARNLCAKEDLYPHPLVQDILWASLHKIVEPVMRWPG-ANLREKAI RTAIEHIHYE 356
<i>S. cerevisiae</i> OSC	FSKNRNTVCGVDLYPHSTTLNIANSLVV-----FYEKYLRNRFIYSLSKKKVYDLIKTE 329
<i>A. acidocaldarius</i> SHC	RGAKGG-----GGWIFDALDRALHG-----YQKLSVHPFRRAAEIRALDWLLERQ 252

<i>H. sapienes</i> OSC	DRFTKISISIGPISKTINMLVRWYVDGPASTAFQEHVSRIPDYLLWGLDGMKMQGTNGSQI 386
<i>B. Liver</i> OSC	DRFTKICISIGPISKTINMLVRWHVDGPASAVFQEHVSRIPDYLLWGLDGMKMQGTNGSQI 386
<i>A. thaliana</i> CAS	DENTRYICIGPVNKVLNMLCCWVED-PNSEAFKLHLPRIHDFLWLAEDGMKMQGYNGSQL 415
<i>S. cerevisiae</i> OSC	LQNTDSLCAIPVNQAFCALVTLIEEGVDSEAFQRLQYRFKDALFHGPQGMTIMGTNGVQT 389
<i>A. acidocaldarius</i> SHC	AGDGSWGGIQPP-WFYALIALKILDMTQHPAFIKGWEGLLEYGVELDYGGWMMFQASISPV 311

<i>H. sapienes</i> OSC	WDTAFAIQALLEAGGHRPEFSSCLQKAHEFLRLSQVPDNPP-DYQKYRQMRKGGFSFS 445
<i>B. Liver</i> OSC	WDTAFAIQALLEARAQHRPEFWSCLRKAHEYLRISQVPDNFP-DYQKYRHMSKGGFSFS 445
<i>A. thaliana</i> CAS	WDTGFAIQAILAT--NLVEEYGPVLEKAHSFVKNSQVLEDCPGDLNYWYRHISKGAWPFS 473
<i>S. cerevisiae</i> OSC	WDCAFAIQYFFVAGLAERPEFYNTIVSAYKFLCHAQFDTECV---PGSYRDKRKGAWGFS 446
<i>A. acidocaldarius</i> SHC	WDTGLAVLALRAAG--LPADHDRLVKAGEWLLDRQIT--VPGDWAVKRPNLKPGGF AFQ 366

*H. sapienes* OSC TLDCGWI VSDCTAEALKAVLLLQEK--CPHVTEH I PRERLCDAVAVLLNMRNPD----GG 499  
*B. Liver* OSC TLDCGWI VADCTAEALKS I LLLQEK--CPFVSNHVP RERLFDTVAVLLSLRNPD----GG 499  
*A. thaliana* CAS TADHGWI SDCTAEGLKAALLSKVP-KE I VGEP I DAKRLYEAVNV I I SLQAD----GG 528  
***S. cerevisiae* OSC** TKTQGYTVADCTAEAIKAI IMVKNSPVFSEVHHM I SSERLFEG I DVLLNLQNI GSF EYGS 506  
*A. acidocaldarius* SHC FDNVYYPDVDDTAVVVWALNTRLRP-----DERRRRDAMTKGFRW I VGMQSSN----GG 416

Met532A

*H. sapienes* OSC FATYETKRGHLELLNPSEVFGDI M I DYTYVECTSAVMQALKYFHKRFP EHR AAE I RET 559  
*B. Liver* OSC FATYETKRGHLELLNPSEVFGDI M I DYTYVECTSAVMQALKTFHKKQFPDHRAGE I RET 559  
*A. thaliana* CAS LATYELTRSYPWLEL I NPAETFGDI V I DYPYVECTSAAI QAL I SFRKLYPGRKKEVDEC 588  
***S. cerevisiae* OSC** FATYEK I KAPLAMETLNPAEVFGDI M V EY P Y V E C T D S S V L G L T Y F H K Y F - D Y R K E E I R T R 565  
*A. acidocaldarius* SHC WGAYDNDNTSDLPNH I PFCDFG--EVTDPPESEDVTAHVLECFG-----SFGYDDAWKV 467

Trp587A

*H. sapienes* OSC LTQGLEFCRRQQRADGSWEGSWGVCFYGTWFGLEAFACMGQTYRDGTACAEVSRACDFL 619  
*B. Liver* OSC LEQGLQFCRQKQRPDGSWEGSWGVCFYGTWFGLEAFACMGHTYHNGVACAE I SRACDFL 619  
*A. thaliana* CAS IEKAVKFI ES I QAADGSWYGSWAVCFYGTWFGVKGLVAVGKTLKN---SPHVAKACEFL 645  
***S. cerevisiae* OSC** IRIAI E F I K K S Q L P D G S W Y G S W G I C F T Y A G M F A L E A L H T V G E T Y E N ---S S T V R K G C D F L 622  
*A. acidocaldarius* SHC IRRAVEYLKREQKPDGSWFGRWGVNLYGTGAVVSALKAVG I DTREP----YIQALDWW 523

*H. sapienes* OSC LSRQMADGGWGEDFESCEERRY--LQSAQSQ I HNTCWAMMGLMAVRHPD I EAQ--ERGVR 675  
*B. Liver* OSC LSRQMADGGWGEDFESCKRRY--VQSAQSQ I HNTCWALMGLMAVRHPDVAAL--ERGV S 675  
*A. thaliana* CAS LSKQQPSGGWGESYLSCQDKVYSNLDGNRSHVVNTAWAMLAL I GAGQAEVDRKPLHRAAR 705  
***S. cerevisiae* OSC** VSKQMKDGGWGESMKSSSELHSY--VDSEKSLVVQTAWAL I ALLFAEYPNKEVI--DRG I D 678  
*A. acidocaldarius* SHC EQHQNPDGGWGEDCRSYEDPAY--AGKGASTPSQTAWALMAL I AGGRAESEAR--RGVQ 579

	Phe699A	Tyr707A	
<i>H. sapienes</i> OSC	CLLEKQLPNGDWPQENIAG-VFNKSCA	ISYTSYRNIFPIWALGRFSQLYPERALAGHP-	732
<i>B. Liver</i> OSC	YLLEKQLPNGDWPQENISG-VFNKSCA	ISYTSYRNIVFPIWTLGRFSRLHPDLAGHP-	732
<i>A. thaliana</i> CAS	YLINAQMENGDFPQQEIMG-VFNRCMI	TYAAYRNIFPIWALGEYR--CQVLLQQGE--	759
<i>S. cerevisiae</i> OSC	LLKNRQEESGEWKFESVEG-VFNHSCA	IEYPSYRFLFPIKALGMYSRAYETHL-----	731
<i>A. acidocaldarius</i> SHC	YLVETQRPDGGWDEPYTGTGFP	GDFYLYGTYMYRHVFPTLALGRYKQAIERR-----	631

圖 1-22：OSC、CAS、SHC 的序列比對圖。以 SHC 蛋白結構為模板，依 SHC 活性區域 29 個胺基酸位置，利用分子模擬與胺基酸序列比對，對應於人類 OSC、牛肝 OSC、酵母菌 OSC、阿拉伯芥 CAS 環化酵素結構上之胺基酸位置

在環化家族酵素家族的蛋白質序列，都有一段獨特的胺基酸重複區域，其序列通式為  $[(K/R)(G/A)X_{2-3}(F/Y/W)(L/I/V)X_3QX_{2-5}GXW]$ ，一般稱為 Q-W 活性功能區域 (Q-W Motif)，在 SHC 重複了八次、而在 OSC、CAS、AMS 與 LUS 中各重複了五次<sup>[61]</sup> (圖 1-23)。一般認為環化酵素的 Q-W Motif 與酵素催化過程涉及的十幾個鍵的斷裂、生成，以及和引起的高度放熱反應所釋放的焓(enthalpy)有關，可能是反應受質在酵素內環化重組所形成鍵能的改變，藉由電子轉移過程吸收反應熱而不至於破壞酵素結構<sup>[62]</sup>。而在這些環化酵素中，Tyr 及 Trp 有高度保留性，配合酵素環化過程可能生成許多高能帶正電中間物的特性，一般認為，這些胺基酸可能因富含電子的側鏈，能穩定催化過程所生成的高能中間物，而在演化上被高度保留下來，此推測也符合 Griffin 所提出的 Aromatic Hypothesis 的理論模組<sup>[63]</sup>。

SHC (A.a.)	QW6	17	RAVEYLLSCQKDEGYW	32
OSC (S.c.)	QW6	79	NGASFFKLLQEPDSGIF	95
CAS (A.t.)	QW6	99	RGLDFYSTIQAHDGHW	114
AMS (P.g.)	QW6	102	RAVHFFSALQASDGHV	117
LUS (A.t.)	QW6	101	RGVRYFTALQASDGHV	116
SHC (A.a.)	QW5c	63	KIRRYLLHEQREDGTW	78
OSC (S.c.)	QW5	127	ELIRYIVNTAHPVDGGW	143
CAS (A.t.)	QW5	139	EMRRYLYNHQNEDEGGW	164
AMS (P.g.)	QW5	152	EILRYIYCHQNEDEGGW	167
LUS (A.t.)	QW5	151	EMLRHIYCHQNEDEGGW	166
SHC (A.a.)	QW5b	243	RALDWLLERQAGDGSW	258
SHC (A.a.)	QW5a	335	KAGEWLLDRQITVPGDW	363
SHC (A.a.)	QW4	402	KGFRWIVGMQSSNGGW	417
SHC (A.a.)	QW3	470	RAVEYLKREQKPDGSW	485
OSC (S.c.)	QW3	568	IAIEFIKKSQLPDGSW	583
CAS (A.t.)	QW3	591	KAVKFIESIQAADGSW	606
AMS (P.g.)	QW3	594	NAVRYLEDTQMPDGSW	609
LUS (A.t.)	QW3	591	KAVGFIQDNQTPDGSW	606
SHC (A.a.)	QW2	528	KALDWVEQHQNPDGGW	533
OSC (S.c.)	QW2	617	KGCDFLVSKQMKDGGW	632
CAS (A.t.)	QW2	640	KACEFLLSKQQPSGGW	655
AMS (P.g.)	QW2	643	KAVEFLLKSQMDDEGGW	658
LUS (A.t.)	QW2	640	NGVHFLLLTTQRDDGGW	655
SHC (A.a.)	QW1	576	RGVQYLVETQRPDGGW	591
OSC (S.c.)	QW1	675	RGIDLLKNRQEESGEW	690
CAS (A.t.)	QW1	702	RAARYLINAQMENGDF	718
AMS (P.g.)	QW1	705	RAAKLLINSQMEDGDF	720
LUS (A.t.)	QW1	702	RAAKLIINSQLENGDF	717

圖 1-23 : Q-W 區域在環化酵素家族內之分佈情形

*A. acidocaldarius* (A.a.) SHC ; *S. cerevisiae* (S.c.) OSC ; *A. thaliana* (A.t.) CAS ; *P. ginseng* (P.g.) AMS ; *A. thaliana* (A.t.) LUS。

## 1-5 研究目的

### 研究概述

鯊烯環化酵素及氧化鯊烯環化酵素是三萜類生合成途徑中的重要酵素，由於其在生理及演化上的重要性，因此酵素的催化機制與結構上的殘基(Residue)所執行的功能，一直是我們所關注積極探討的目標。在蛋白質結構的領域中，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)解出蛋白質結構，但上述二種方法有其限制，NMR 只能解出分子量小的蛋白質(約小於 30KDa)，X-ray 單晶繞射必須先養出蛋白質的單晶，但養單晶的條件複雜且須純化出一定數量的蛋白質。而我們所研究的 OSC 是一種膜蛋白，分子量大且不穩定不易被純化，因此無法得到 OSC 的結構資訊。而在目前的研究當中，利用生物資訊的方式研究酵素催化機制及抑制劑、藥物的探討，已經是目前很普遍進行的方法<sup>[64]</sup>。通常對於結構資訊尚未闡明的蛋白質，會利用同源的物種，經序列比對模擬出可能的結構，繼而進行更進一步的實驗討論<sup>[65]</sup>。

而在酵素催化機制的研究中，利用突變的技術研究蛋白質功能上的變化或影響，已經是蛋白質工程及分子生物技術一種很常被應用的方法。突變的方式最常見的有二種，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做突變，通常會不知道被突變的位置，且突變的量大而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。

先前的研究指出，對這些鯊烯環化酵素及氧化鯊烯環化酵素作基因分析及蛋白質序列比對，發現這些酵素可能源自於同一遠古基因，同屬於自然界的三萜類環化酵素家族，由於物種間的散開演化過程，而形成各自的物種專一性環化酵素<sup>[65]</sup>。一些研究指出，不同物種的環化酵素可能有類似的催化機制，但也許因為演化使得酵素活性區域上的結構有些微的差異，可能由於這些微小的差異造成了環化酵素的產物多樣性<sup>[66, 67]</sup>。例如在高等植物與動物、真菌類有相同的環化機制，但在氫化基(hydride)、甲基轉移的重排重組後，由於酵素活性區上些許差異，活性區上穩定高能碳陽離子中間物基團所在的位置不同，最後反應會停在不同的碳陽離子中間物而脫氫生成不同產物，例如在高等植物會生成 C8-碳陽離子中間物，在動物或真菌中會生成 C9-碳陽離子中間物，因此造成了各自的物種專一性。(圖 1-24)

因此，想利用上述的概念去探討氧化鯊烯環化酵素的催化機制，而我主要的研究重點於：

1. 利用定點突變的技術，改變酵母菌氧化鯊烯酵素(OSC)活性區域上胺基酸，以人為方式進行分子演化，藉由對突變株的產物分析，探討環化酵素活性區結構與催化機制的相關性，進一步闡明活性區域的殘基各自在催化機制上所扮演的角色。
2. 透過突變株產物圖譜與比例的建構，探討產物專一性與多樣性，希望能更進一步了解環化酵素家族彼此間的演化性及催化反應上的差異。
3. 探討氧化鯊烯環化酵素在受質的起始質子化、開環、環化、甲基與氫轉移，重排重組的複雜機制。
4. 利用飽和突變的技術，更細部探討酵素反應活性區中的某個位置，在催化上所參與機制及功能角色。

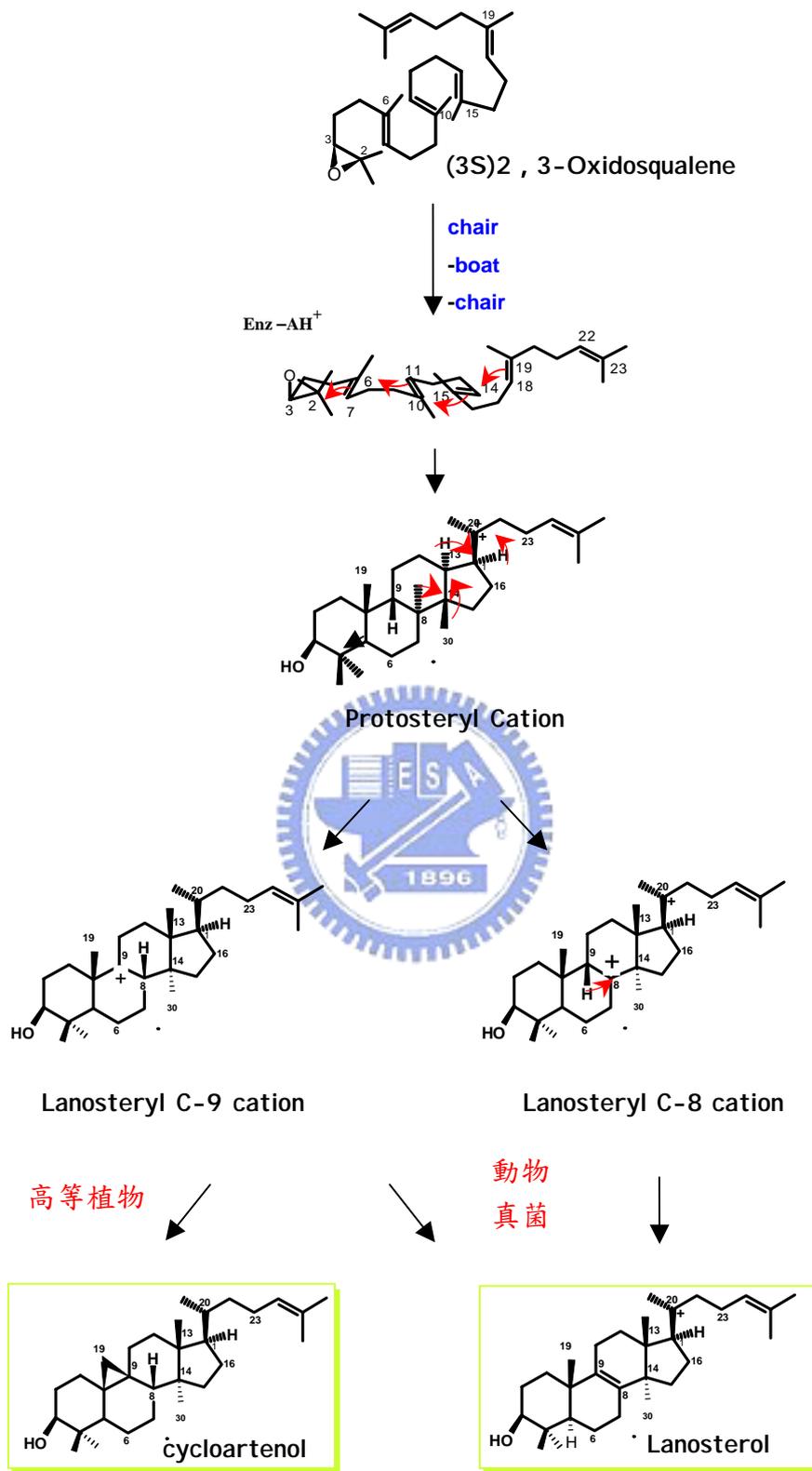


圖 1-24：不同物種環化酵素，因活性區些微差異形成物種專一性產物

為了詳細了解氧化鯊烯-羊毛硬脂醇環化酵素(Oxidosqualene-Lanosterol Cyclase ; OSC)的活性區結構與產物專一性的關係，我們想針對活性區上胺基酸進行定點突變。雖然目前對 OSC 的結構資訊還不清楚，但其同源家族的 SHC X-ray 晶體結構已發表在 1997 年 science 期刊，指出 SHC 酵素蛋白質立體結構的活性區範圍，及活性區 29 個胺基酸的相對位置<sup>[68, 69]</sup>。所以我們利用分子模擬的方式，以 SHC X-ray 晶體結構為模板，經序列比對的方式找出相應於 OSC 上的活性區胺基酸，再經丙胺酸掃描法(Alanine Scanning)，也就是把假設的活性區胺基酸突變成丙胺酸，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之時，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，已清楚的建立反應受質經重排重組後形成碳陽離子中間物的可能催化機制<sup>[70, 71]</sup>。配合這些理論模組及催化機制，假若此胺基酸在環化的催化過程中具有決定性影響，則氧化鯊烯經此重要突變酵素作用，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產物多樣性。

我們利用死/活篩選(Die/Live selection)的篩選策略，初步先篩出哪些活性區胺基酸的突變效應，對 OSC 活性有顯著的關鍵影響，繼而再進一步大量培養，分析突變株產物圖譜來探討殘基在環化過程所執行的功能。例如當我們去改變酵素活性區上靠近反應受質 C、D 環間的胺基酸殘基，很可能會使氧化鯊烯形成碳陽離子中間物後，甲基與氫的轉移被中止在 C、D 環間而形成 3 環產物或有不同的雙鍵位置(圖 1-25)。

透過這些實驗假設，設計了丙胺酸掃描法(Alanine scanning)的定點突變，希望能更進一步闡明氧化鯊烯-羊毛硬脂醇環化酵素的反應機制，視其活性區域胺基酸的突變效應，會否影響或改變了 OSC 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。而後針對這些被分析出對環化重組的催化機制上有重要影響的位置，進行飽和突變實驗(Saturated mutagenesis)，將此位置突變成其餘 19 種胺基酸，再進行產物分析，透過這些細部的分析，驗證這些胺基酸基團在催化上的生化意義，並以電腦模擬說明這些胺基酸基團的空間相關性，進一步佐証環化的反應機制。



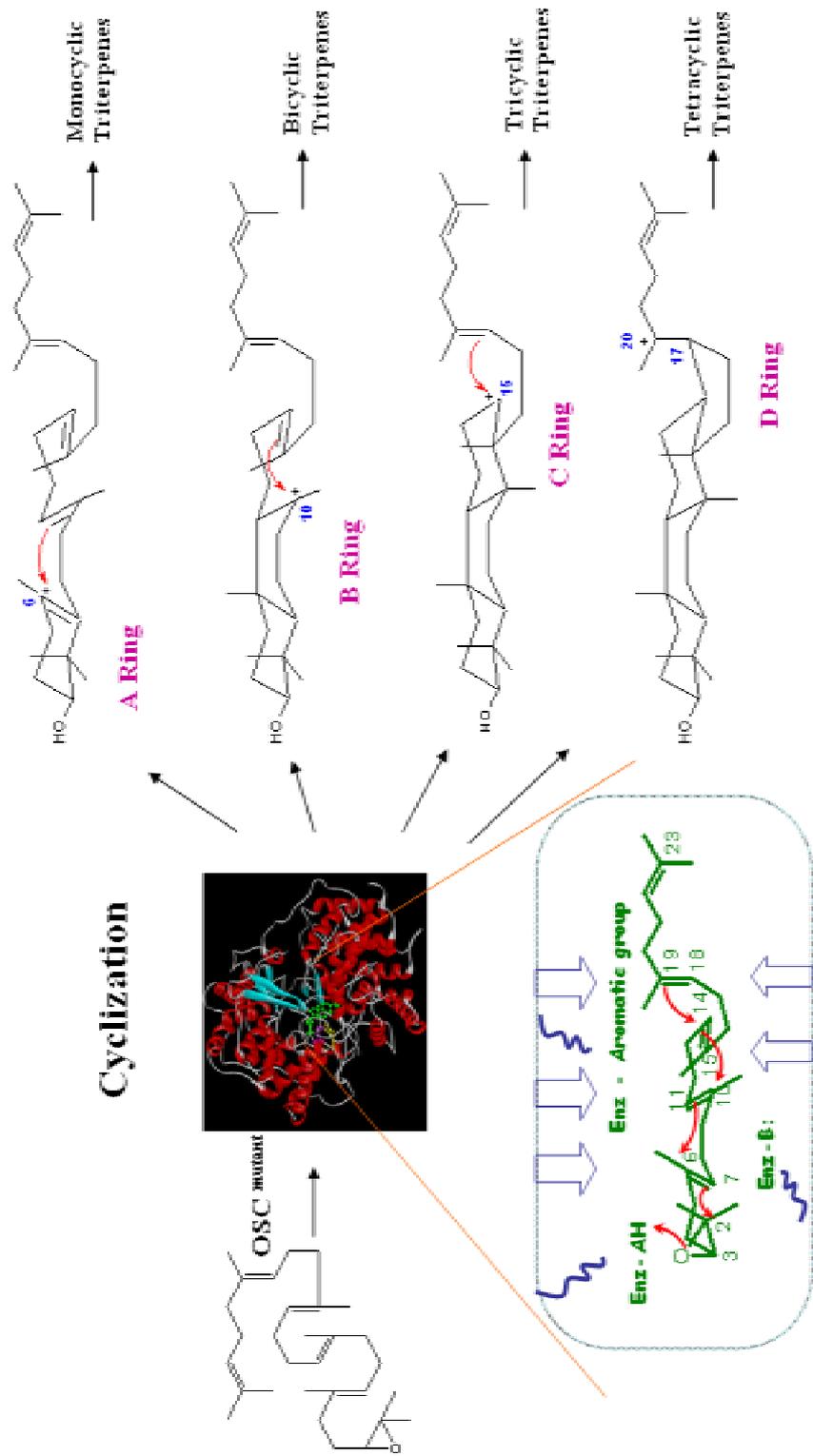


圖 1 實驗動機之假設  
經定點突變後，產物是否仍為原本OSC產物——羊毛硬脂醇，或生成不同環數或雙鍵位置不同的產物，甚至形成其他環化酵素家族的產物

## 實驗策略流程

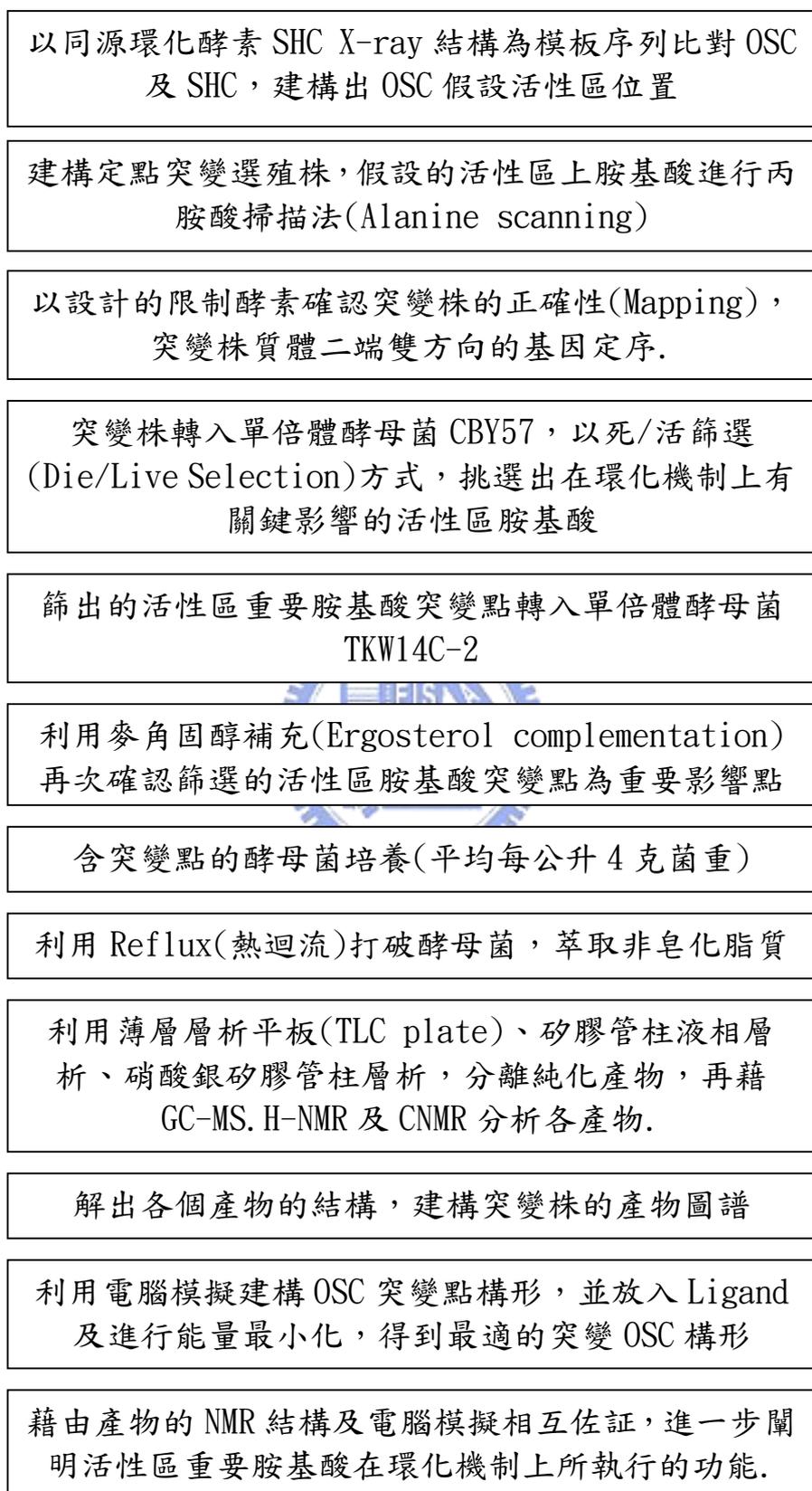


圖 1-26：實驗策略流程

## 第二章 實驗材料與方法

### 2-1 實驗材料 (Material)

#### 2-1-1 化學藥品與材料

QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit 購自於 Stratagene

培養液的成分 Trypton、Yeast Extract 購自於 DIFCO

建構質體的限制酵素購自於 New England BioLabs Inc.

接合酵素 *T4* DNA ligase 購自於 Promega

洋菜凝膠 (Agarose) 購自於 USB

DNA 染色劑 (SYBR Green I) 購自於 Roche

聚合連鎖反應試劑 dNTP 及引子 (Primer) 購自於誠樺實業有限公司  
Biobasic Inc.

GFX Micro Plasmid Prep Kit、Gel Band Purification Kit 購自於  
Amersham Pharmacia Biotech

Sodium sulfate ( $\text{NaSO}_4$ )、Ethyl acetate (EA)、Ether、Hexane、Potassium hydroxide (KOH)、Dichloromethane ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ )、Silver nitrate ( $\text{AgNO}_3$ )、Acetone、Sea sand 購自於默克

Ergosterol、Glucose、Adenine、Lysine、Histidine、Trptophan、Methionine、Uracil、Pyrogallol 購自於 Sigma

Hemin Chloride 購自於 CALBIOCHEM

## 2-1-2 儀器

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 ( Beckman, DU 7500 Spectrophotometer )

高速離心機 ( Beckman, Allegra 21 Series )

電泳槽 ( Amersham Pharmacia Biotech )

脈衝控制器 ( BioBad , Pulse Controller )



## 2-1-3 菌株與載體

菌株與載體及培養基成分

菌株:

**XL1-Blue :**

大腸桿菌之一株，購自於 Stratagene 公司。

**CBY57 :**

為酵母菌的一種菌株 ( MATa or MAT $\alpha$  ERG7 $\Delta$ :: LEU2 *ade2-101 his3- $\Delta$ 200 leu2- $\Delta$ 1 lys2-801 trp1- $\Delta$ 63 ura3-52 [ pZS11 ] )，可供菌株選殖篩選之用。另外，此菌中含有質體 pZS11 帶有 ERG7 可彌補酵母菌體中 ERG7 的缺陷。*

**TKW14C2 :**

為酵母菌的一種菌株 ( MATa or MAT $\alpha$  ERG7 $\Delta$ :: LEU2 *ade2-101*

*his3-△200 leu2-△1 lys2-801 trp1-△63 ura3-52 hem1△::kan<sup>R</sup>*), 可供菌株選殖篩選之用, 並以此為宿主大量培養含突變的 OSC, 用以獲得突變產物。

#### **載體 RS314 :**

購自於 New England BioLabs 公司。載體 RS314 是一可穿梭於酵母菌 *S. Cerevisiae* 和大腸桿菌 *E.coli* 間的載體 ( Shuttle Vector ), 帶有選擇性標記 *Trp1* 。

### **2-1-4 溶液與緩衝液**

#### **5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl $\beta$ -D-Galactoside ( X-Gal ) :**

取 X-gal 溶於 Dimethylformamide ( DMF ), 濃度為 20 mg/mL, 避光儲存於 -20 。

#### **20 % Isopropyl $\beta$ -D-Thiogalactopyranoside ( IPTG ) :**

將 2 g IPTG 溶於 8 mL 二次去離子水中, 再用二次去離子水補至 10 mL, 以 0.2  $\mu$ m 的濾膜過濾, 使其呈無菌狀態。

#### **100 mg/mL Ampicillin :**

將 Ampicillin 溶於二次去離子水, 再用 0.2  $\mu$ M 濾膜過濾, 去除雜菌, 儲存於 -20 。

#### **TAE Buffer :**

40 mM Tris acetate, 2 mM EDTA, pH 8.5, 存於室溫。

#### **80 % Glycerol :**

80 mL Glycerol 加入 20 mL 一次去離子水混勻, 高壓滅菌後存於室溫。

#### **50 X ALTH :**

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

**50 X ALHU :**

0.2 % Adenine , 0.3 % Lysine , 0.2 % Histidine , 0.2 % Uracil , 經高壓滅菌後存於 4 °C 。

**50 X ALH :**

0.2 % Adenine 、0.3 % Lysine 、0.2 % Histidine 經高壓滅菌後存於 4 °C 。

**50 X ALTHMU :**

0.2 % Adenine , 0.3 % Lysine , 0.2 % Tryptophan , 0.2 % Histidine , 0.2 % Methionine , 0.2 % Uracil , 經高壓滅菌後存於 4 °C 。

**50 X ALHMU :**

0.2 % Adenine , 0.3 % Lysine , 0.2 % Histidine , 0.2 % Methionine , 0.2 % Uracil , 經高壓滅菌後存於 4 °C 。

**20 % EA :**

Ethyl Acetate : Hexane = 1 : 4 。

**TLC 染液 :**

95 % Alcohol : Sulfonic Acid (conc.) : *p*-Anisaldehyde = 18 : 1 : 1 。

**5 X Sequence Buffer :**

400 mM Tris-HCl 、10 mM MgCl<sub>2</sub> 、pH 9.0

Tris-HCl 取 4.85g、MgCl<sub>2</sub> 取 0.203g 溶於 100 mL 的一次水調 pH 至 9。

**2-1-5 培養基****LB Media :**

每升培養液的成份含 10 g Trypton 、5 g Yeast Extract 、5 g NaCl 、2 g Glucose , 均為滅菌後 , 於使用前加入抗生素 Ampicillin ( 最後總濃度為 100 µg/mL ) 。

**SD :**

0.17 % Yeast Nitrogen Base ( without amino acids or ammonium sulfate ) 。

**ALH Plate :**

0.17 % Yeast Nitrogen Base ( without amino acids or ammonium sulfate ) , 1.5 % Agar ( 固體培養基 ) , 經高壓滅菌後加入 2 % 50X ALH , 2 % Glucose , 1M Sorbitol ( 於進行電穿透作用時使用 ) 。

**ALHU Plate :**

0.17 % Yeast Nitrogen Base ( without amino acids or ammonium sulfate ) , 1.5 % Agar , 經高壓滅菌後加入 2 % 50X ALHU , 2 % Glucose 。

**ALHU / FOA Plate :**

0.17 % Yeast Nitrogen Base ( without amino acids or ammonium sulfate ) , 2 % Glucose , 1.5 % Agar , 經高壓滅菌後加入 2 % 50X ALHU 以及每 1mL 培養液加 1 mg 5'-FOA 。

**ALHMU / Heme / Ergosterol Plate :**

0.17 % Yeast Nitrogen Base ( without amino acids or ammonium sulfate ) , 1.5 % Agar , 經高壓滅菌後加入 2 % 50X ALHMU , 2 % Glucose , 13  $\mu$ l / 1 c.c 培養液 Heme , 13  $\mu$ l / 1 c.c 培養液 Ergosterol 。

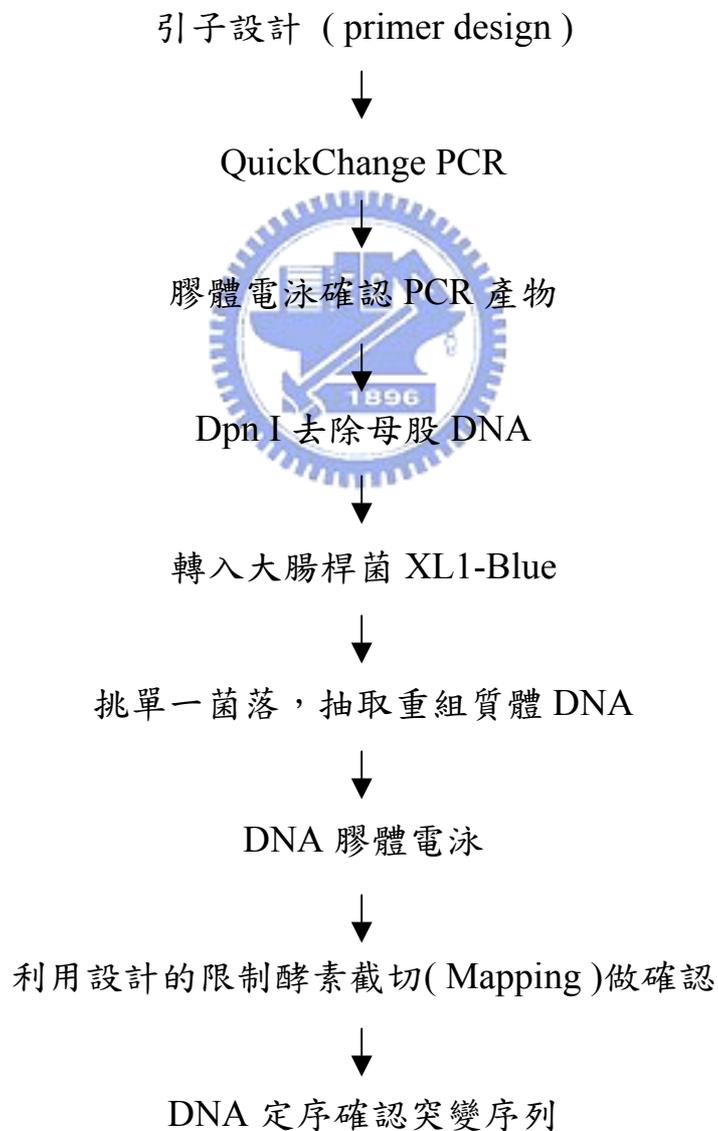
## 2-2 實驗方法

### 2-2-1 重組質體的建構

#### (The construction of recombinants)

##### 選殖策略一 飽和突變實驗

##### 飽和突變實驗策略(Saturated mutagenesis strategies)



第一種方法是利用 Stratagene ( Merck 代理 )的 QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit。先設計含有靜默突變 ( Silent Mutation ) 及定點突變的互補引子( Primer )，以 RS314WT( 含有正常 OSC 序列的載體 )為模板，利用 QuickChange PCR 的方法，加入 *Pfu* polymerase 聚合酶以 PCR 方式 ( 表 2-1, 2-2 ) 放大而得到的 DNA 產物，再利用 *DpnI* 限制酶截切甲基化 DNA 之特性，去除母股，只留下含有定點突變之突變點(表 2-3)。以此方式建構飽和突變( Saturated mutagenesis ) 突變株 ( 圖 2-1 )。

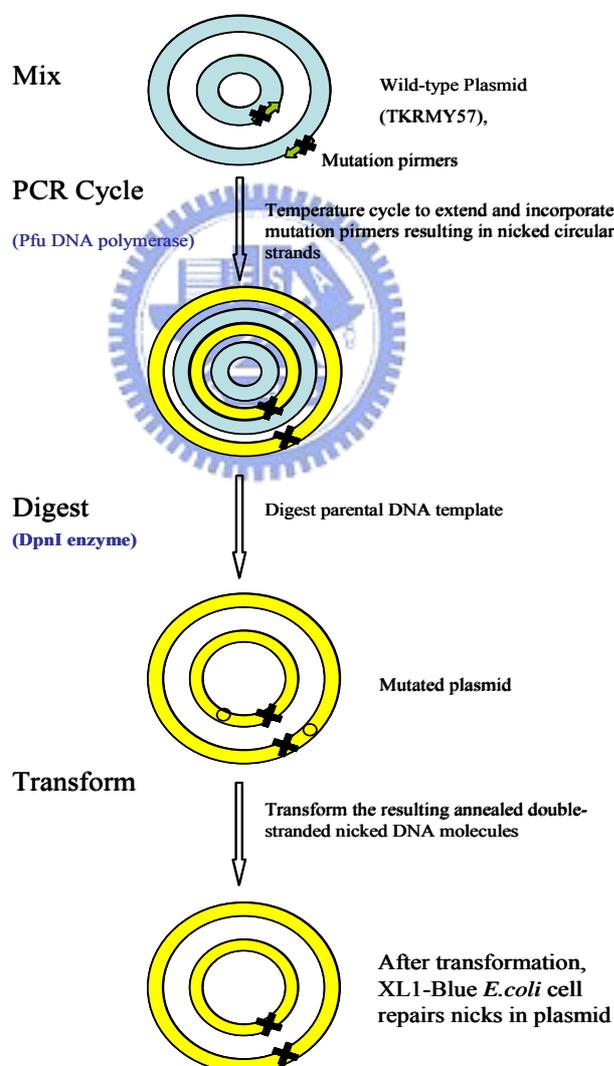


圖 2-1 選殖策略一 QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit

## 引子設計 ( primer design )

Wildtype

P M H P G R W W V H T  
5' CCC ATg CAT CCg ggg AgA Tgg Tgg gTT CAT ACT 3'

MTY W232 primer 1(Sma I)

P M H P G R W # V H T  
5' CCC ATg CAT CCC ggg AgA Tgg NNN gTT CAT ACT 3'

*Sma I*

MTY W232 primer 2

5' AgT ATg AAC NNN CCA TCT CCC ggg ATg CAT ggg<sup>3'</sup>

*Sma I*

MTY W232 CFY 1 (Sma I)

P M H P G R W # V H T  
5' CCC ATg CAT CCC ggg AgA Tgg T(g/A/T)C gTT CAT ACT 3'

*Sma I*

MTY W232 CFY 2

5' AgT ATg AAC g(A/T/C)A CCA TCT CCC ggg ATg CAT ggg<sup>3'</sup>

*Sma I*

MTY W232 DKIM 1 (Sma I)

P M H P G R W # V H T  
5' CCC ATg CAT CCC ggg AgA Tgg (g/A) (A/T) (g/C) gTT CAT ACT 3'

*Sma I*

MTY W232 DKIM 2

5' AgT ATg AAC (g/C) (A/T) (T/C) CCA TCT CCC ggg ATg CAT ggg<sup>3'</sup>

將突變處設計在 primer 上，利用 PCR 放大可直接得到突變點。突變處在 primer 上前後約各需 3~5 個胺基酸距離，以利黏合反應 (Annealing)。由於飽和突變實驗是將欲突變處突變成其他 19 種胺基酸，所以 primer 的突變處設計為 NNN，N 代表 A、T、C、G 四種鹼

基，因此 primer 包含了 64 種可能性。在 primer 上設計靜默突變，可被特定限制酵素截切，而原本的模板 RS314WT 不會被切，利用此方法區分突變點與 RS314WT(未突變的 OSC)。

反應物	體積(單位 $\mu\text{L}$ )
Template	1
Primer 1 (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	0.125
Primer 2 (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	0.125
10X <i>Pfu</i> Buffer	5
dNTP (10mM)	4
DDW	38.75
<i>Pfu</i> polymerase	1
Total reaction volume	50

表 2-1 : QuickChange Site-Directed Mutagenesis 聚合酶連鎖反應組成

部分	循環次數	溫度	時間
1	1	95°C	2 分
2	18	95°C	30 秒
		Primer $T_m - 5\sim 8^\circ\text{C}$	1 分
		68°C	16 分
3	1	4°C	$\infty$

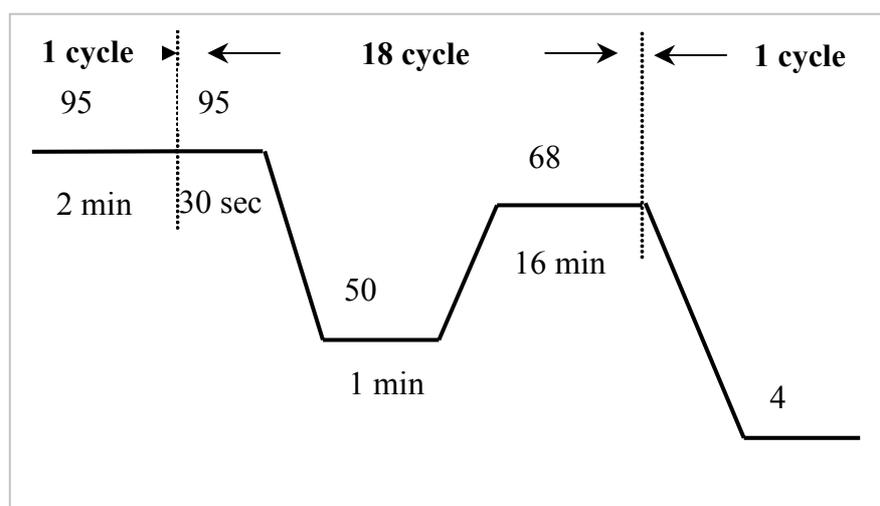


表 2-2 : QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit 使用之聚合酶連鎖反應放大程式

反應物	體積(單位 $\mu\text{L}$ )	
PCR 產物	50	
	25	25
10 $\times$ NE Buffer 4	3	3
DDW	1	1
<i>DpnI</i>	1	1

表 2-3 : QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit PCR 產物處理

## 選殖策略二

第二種方法是參考質體上限制酵素之切點，挑選適當的限制酵素進行基因片段的置換，利用此法將 W232A 與 Y510A、W232A 與 Y510K、H234A 與 Y510A 進行切接置換，完成含雙點突變之突變株 (圖 2-2)。

雙點突變建構策略:

選取適合的限制酵素截切質體，獲得含突變點的區段

以 DNA 膠體電泳分離限制酵素作用後的片段

Gel Extraction 獲得 insert DNA 及 vector

接合(Ligation)

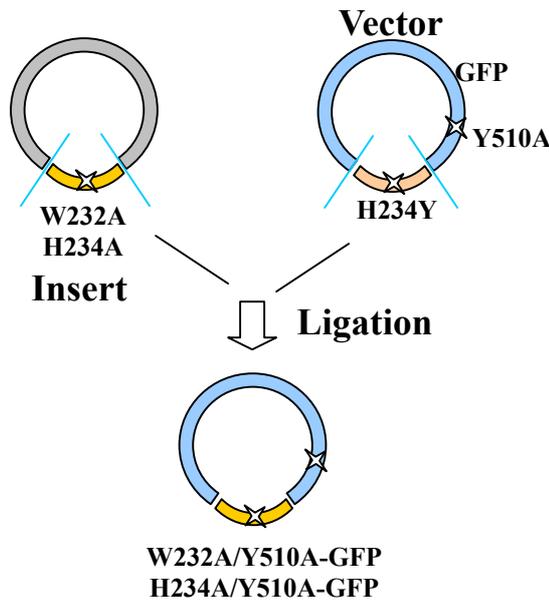
轉入大腸桿菌 XL1-Blue

挑單一菌落，抽取重組質體 DNA

DNA 膠體電泳

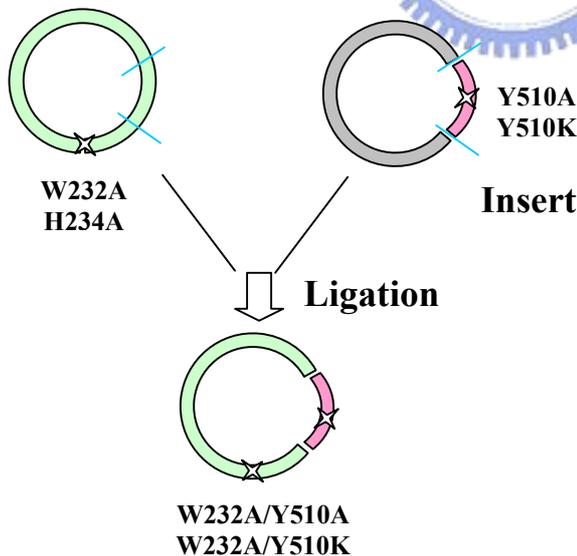
利用設計的限制酵素截切(Mapping)做確認

方法一：



1. *Not I*, 3+BSA, 37°C / *Nco I*, 1~4, 37°C
2. *Sac I*, 1 or 4+BSA, 37°C / *Hpa I*, 4, 37°C

方法二：



1. *Pst I*, 3, 37°C / *Xho I*, 2~4+BSA, 37°C
2. *Pst I*, 3, 37°C / *Bsp1407 I*

載體 (Vector) 與欲殖入之 DNA (Insert) 分別利用限制酵素於 37 °C 恆溫槽作用 (Digest) 3 至 4 小時(表 2-4)(若使用單一限制酶時，載體 DNA Digest 後需加入 CIP 酵素、CIP Buffer 與二次水，繼續於 37 °C 恆溫槽作用 2 小時，以移除載體末端的磷酸根，再將 DNA 換至 65 °C 恆溫槽作用 20 分鐘，確保 CIP 酵素終止反應)，把 DNA 由恆溫槽取出，加入 2 μL 6 倍的 Loading Buffer 及 2 μL SYBR Green I，利用 0.8 % 洋菜凝膠 (Agarose Gel) 以電壓約 100 伏特進行電泳，將經限制酵素作用後正確大小之載體與欲接入之 DNA 切下質帶，以 Gel Band Purification Kit 純化膠體中之 DNA，以一定比例(Insert:Vector = 10: 1 or 6:1 or 15:1 or 1:3) 混合後再加入接合酵素 ( $T_4$  DNA Ligase)，於 25 作用 3 小時。

圖 2-2 建構雙點突變的二種方法

接合反應完成後，將反應產物以熱導入(heat shock)方式轉入大腸桿菌 XL1-Blue，於 37°C，1 毫升 LB 培養液培養一小時，待菌長起後稍微離心去除上清液，將 pellet 回溶塗於 Amp/LB 盤上培養 16~20 小時，待菌長起後，挑單一菌落入 3 毫升 Amp/LB 溶液培養約 12 小時，使菌達至一定濃度後抽取質體 DNA。選取適合的限制酵素截切做初步確認，之後以 DNA 定序方式進一步確認雙點突變序列的正確性。

反應物	體積(單位 $\mu\text{L}$ )
Plasmid DNA	2
10 $\times$ NE Buffer	1
Restrict Enzyme	1
BSA	1
加水體積補至 10 $\mu\text{L}$	

表 2-4：接合反應前以適當限制酵素處理質體 DNA 的條件

## 2-2-2 質體 DNA 轉殖入活細胞中

### (Introduction of DNA into living cells)

→ 將質體導入大腸桿菌(*E. coli*)或酵母菌(yeast)主要利用二種方式，  
Heat-shock(熱導入)及電穿孔(Electroporation)

#### 1. 大腸桿菌勝任細胞的製備(Preparation of competent *E. coli* cell)

活化欲轉形的大腸桿菌 XL1-Blue cell，取少許在 Tetracycline (100g / 1 mL) 的 LB 培養皿上畫 4 區，於 37 °C 隔夜培養。由 Tetracycline / LB plate 挑取單一菌落，接種於 500 ml SOB 培養液，在固定轉速 (200~250 rpm) 的 37 °C 培養箱震盪培養，至 O.D 值達到  $A_{600} = 0.5 \sim 0.6$ ，將菌液冰浴 10 分鐘，在轉速 2500 xg，4 °C 下離心 10 分鐘去上清液，細胞沈澱物以 160 ml TB Buffer 沖洗再懸浮，置於冰上 10 分鐘，以相同條件再離心一次，去上清液，小心地加入 40 ml TB Buffer 使細胞沈澱物再懸浮，再加入抗凍劑 DMSO (Dimethyl Sulfoxide) 2.8 ml，使其最後濃度約 7%，冰浴 10 分鐘，將細胞懸浮液以每 300  $\mu$ l 分裝，立即放入液態氮中急速冷凍，將此凍結的 XL1-Blue cell 凍存於 -80 °C 冰箱，此為熱導入 heat-shock 用的勝任細胞

#### 2. 轉形作用--大腸桿菌吸收重組質體 ( Transformation -- the uptake of recombinant DNA by *E. coli* )

##### a. 熱導入 ( Heat shock )

質體轉入勝任細胞 XL1-Blue 置於冰上緩慢融解，與要送入的質體 DNA 混合冰浴 20 分鐘，XL1-Blue 利用冰浴及  $\text{CaCl}_2$  處理，使

得質體 DNA 沈澱於細胞外藉由溫度短暫提高至 42 °C 1 分鐘，此時膜的通透性增加，膜的孔洞變大，使得附著於細胞外面的質體 DNA 可被吸收進入 *E.coli* 中，再立刻冰浴 1 分鐘，使膜的孔洞通透性變小，轉形細胞利用此熱導入方法，可將重組質體 DNA 轉入 *E.coli* 中。將此轉殖勝任細胞置於 1 毫升 LB 培養液中，於 37 °C，200 rpm 培養 1~2 小時，取 200 µl 塗於 Ampicillin / LB plate (若菌不濃，則先稍微離心，去上清液，回溶菌體再塗盤) 在 37 °C 培養 16~20 小時後，挑單一菌落入 3 毫升 Amp / LB 養 12~16 小時，利用 GFXMicro Plasmid Prep kit 抽取質體 DNA，再利用設計好的限制酵素切位確認重組 DNA 的正確性。由於 XLI-Blue 含 *tetr* gene (XL1-Blue 帶有 Tetracycline 抗性基因) 而質體 PRS314 帶有抗 Ampicillin 的基因，因此可利用 Amp / LB plate 篩選轉形細胞，只有轉型成功的細胞可同時在 Amp / LB plate 及 Tet / LB plate 生長。

#### b. 酵母菌株 CBY57 及 TKW14C2 的電穿孔作用

此方法將重組質體利用脈衝控制器以電穿孔的方式進入酵母菌菌株 CBY57。在 30 °C 的培養箱中將 CBY57 培養於 SD 含 Ade + Lys + Trp + His + Glucose 的培養液，當菌液之 OD 值達到  $A_{600} = 1 \sim 1.5$  間。此時將菌液分裝至四個 50 mL 的離心瓶中，於 4 °C 下以 3000 rpm 十分鐘將細胞離心下來，再以 50 mL 之 4 °C 無菌水將細胞懸浮，重複前述方法將細胞離下。利用 25 mL 的 4 °C 無菌水將細胞懸浮，重複前述方法將細胞離下。以 4 mL 無菌的 1M Sorbitol 將細胞懸浮，將四管合併成一管再度以前述方法將細胞離下。用 50 µL 乘以重組質體樣品數的無菌 1M Sorbitol 體積將細胞懸浮。取 50 µL 菌液加入 2 µL 重組質體，將混合液冰浴 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以 1.5 kV，200 mA，25  $\mu$ F 進行電穿透作用。在電擊後立刻加入 500  $\mu$ L 無菌的 1M Sorbitol 將細胞懸浮混勻，各取 50  $\mu$ L 與 200  $\mu$ L 塗於含 ALH ( Ade + Lys + His ) 之培養皿，待菌液稍乾，反置入 30  $^{\circ}$ C 恆溫箱中培養 3 至 5 天，經成功轉化之細胞會長至清晰可見之菌落。

將重組質體以電穿孔方式轉入酵母菌菌株 TKW14C2 的方法同上述，但 TKW14C2 與 CBY57 相比，其不含正常的 OSC 功能 ( 不含 *ERG7* 基因 ) 且 *Heme* 基因被置換掉，因此培養液要額外補充 Hemin + Ergosterol + Met ( Methionine 在體內的生合成與 *Heme* 基因相關，當 *Heme* 基因被置換掉，Methionine 的生合成會受影響，故要額外補充 )。因此將 TKW14C2 培養在 SD+ Glucose + Ade + Lys + Trp + His + Met + Hemin + Ergosterol 於 30  $^{\circ}$ C 培養，其餘步驟同 CBY57，而後塗盤在 Glucose + ALHMU ( Ade + Lys + His + Met + Ura ) + Hemin + Ergosterol 之培養皿，等待成功轉化之細胞長至清晰可見之菌落。

### 2-2-3 質體交換 (Plasmid Shuffle) / 死/活篩選 ( Die / Live selection )

將已進行轉化作用之酵母菌取 200  $\mu$ L 塗於含有 SD + Ade + Lys + His + 1M Sorbitol 的培養皿上，於 30  $^{\circ}$ C 下培養三至五天，待培養皿長出清晰可見之菌落，將每種質體轉化作用的酵母菌挑數顆菌落個別培養於 3 mL 含有 SD + Glucose + Ade + Lys + His + Ura 的培養液中，培養 24 小時。將過夜之菌落各取 100  $\mu$ L 塗於含

SD + Glucose + Ade + Lys + His + Ura ( 對照組 ) 與 SD + Glucose + Ade + Lys + His + Ura + 5-FOA ( 實驗組 ) 之選擇性的培養皿上，放入 30 °C 培養箱下培養三至五天。由於含 pZS11 的質體無法在含 5-FOA 的環境中生長；因此，能於 SD + Ade + Lys + His + Ura + 5-FOA ( 實驗組 ) 選擇性培養皿上生長的含突變 OSC 重組質體之酵母菌，即表示此突變 OSC 仍具有 OSC 功能可補足 CBY57 中缺少 *ERG7* 之環化酶的功能。若重組質體中之 OSC 功能之基因不具功能性，即無法生長在 SD + Ade + Lys + His + Ura + 5-FOA ( 實驗組 ) 之選擇性的培養皿上，此可能代表突變位置會影響正常的 OSC 環化功能，導致無法生成下游產物供菌生長，透過此種死/活的篩選方式，初步篩選哪些突變位置在 OSC 催化機制上具有重要影響性。



#### 2-2-4 麥角固醇補充篩選

將含突變 OSC 重組質體以電穿透方式轉入酵母菌 TKW14C2，培養於 Glucose + ALHMU ( Ade + Lys + His + Met + Ura ) + Hemin + Ergosterol 之培養皿，待成功轉化之細胞長至清晰可見之菌落，挑數顆菌落分別畫眉於 Glucose + ALHMU ( Ade + Lys + His + Met + Ura ) + Hemin + Ergosterol ( 對照組 ) 及 Glucose + ALHMU ( Ade + Lys + His + Met + Ura ) + Hemin ( 實驗組 ) 兩種培養皿。透過外界補充麥角固醇(Ergosterol)與否，篩選出哪些突變 OSC 已不具 OSC 正常的催化功能，藉此篩出哪些突變位置在 OSC 催化機制上具有重要影響性。此結果與死/活篩選的結果做對照，將篩出具有重要影響的突變 OSC 酵母菌大量培養，以獲得突變產物。

## 2-2-5 酵母菌的培養

將含突變 OSC 重組質體之酵母菌 TKW14C2 接種至 3 mL 含有 SD + Glucose + Ade + Lys + His + Met + Ura + Hemin + Ergosterol 的培養液中培養四至七天，再將長於試管底部之酵母菌打散，把菌液倒入 200 mL 無菌的相同培養液中培養二至三天，經震盪將菌均勻懸浮於培養液裡，再倒入大量 (2~50 L) 無菌的 SD + Glucose + Ade + Lys + His + Met + Ura + Hemin + Ergosterol 培養液中培養五至七天。

## 2-2-6 脂質的萃取

培養五至七天之酵母菌以 4 °C、7000 rpm 下離心 10 分鐘，以 15 % KOH、0.1 % Pyrogallol 將沉澱之細胞懸浮，再加入等體積之 95 % 酒精，於 110 °C 進行 2 小時的熱迴流反應 (Reflux)。利用強鹼高溫打破酵母菌，並以 Pyrogallol 去除掉可皂化的脂質。反應結束後，加入石油醚對非皂化之脂質 (NSL) 進行萃取，取有機層的部分加入無水硫酸鈉去除水分，再進行過濾，接著再利用旋轉蒸空濃縮機使產物乾燥。最後將此非皂化之脂質初萃取物存於 -20 °C 保存待測。

## 2-2-7 薄層色層分析 (Thin Layer Chromatography) 及管柱液相色層分析 (silica gel column chromatography)

一、進行管柱液相層析法分離產物之前，須利用薄層層析法作為指標，試出進行管柱液相層析分離操作時所需要之最佳條件，之後利用液相層析法將樣品中的化合物初步分離。

## 二、薄層層析(TLC)

樣品先回溶於少許的二氯甲烷 ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ )，以毛細管吸收適量點於薄層平板上，再於離平板邊緣 1 至 2 cm 處滴成斑點狀。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，之後利用乙酸乙酯(Ethyl acetate ; EA)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。在平板上最常使用之展佈方式為，先將一滴樣品施加在平板的一邊上，待樣品之溶劑蒸發後，將平板置入一只呈現展佈溶劑之蒸氣飽和態的密閉容器中。將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現象。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。當展佈劑移動至平板的長度達二分之一或三分之二時，可將平板從容器中移出，並予以乾燥，當分離完成後我們利用硫酸溶液會與有機化合物形成深色產物，置於加熱板( Hot plate )上加熱顯色，在 TLC 片上對分析物定位。

粗萃取的非皂化脂質利用 TLC 獲得初步的分佈情形，以 TLC 片上分離的條帶( band )做判斷，決定之後的管柱液相色層分析應該分幾個區段( fraction )收起。

由以上方式，試出最適分離效果的展開液為 20%EA，故而取其本濃度，即 5%EA 做為之後 LC(液相層析)的沖提劑(Eluent)。

### 三、管柱液相色層分析

利用矽膠( silica gel )做為支持的固相填充在管柱中，選取不互溶適當極性的溶液乙酸乙酯( EA )做為流動相的沖提劑( Eluent )，藉由 pump 施壓使其移動分離，不斷加入新鮮溶劑，將物種沖洗流經管柱，在流動相進行傳送，樣品中的化合物會自行分佈於二相之間，利用化合物與固相支持物 silica gel 之間吸附的能力或滯留的程度不同會有進步的分配現象發生，樣品可被初步分離成若干個帶( band )或層域( zone )。再利用 TLC 片，將 TLC 片上同一高度的單一點收成同一部分( 即同 Rf 值收在一起 )，或多個點收成同一部份，以迴旋濃縮儀濃縮後，打 GC/MS(氣相層析/質譜)做進一步分離定性。



#### 2-2-8 硝酸銀矽膠管柱液相色層分析

##### ( Silver ion column chromatography )

一、由於矽膠管柱層析無法將樣品純化出單一化合物，前述 TLC 片上同一高度的單一點收成同一部分，打 GC/MS(氣相層析/質譜)分析發現仍含多個化合物，無法得到樣品中的單一化合物。因此，將矽膠管柱層析收得的部分進行乙醯化反應，再利用銀染 TLC 及銀染管柱層析進一步分離。

##### 二、乙醯化反應 ( Acetylation of LA fraction )

由於矽膠管柱層析收得的部分所含的多個化合物結構相似，因此進行乙醯化反應，將化合物碳 3 上具極性的-OH 基團，反應

成較不具極性的乙醯基團，以便於之後銀染層析的進行，使層析分離完全是依照化合物中的雙鍵與銀螯合的情形，而不受到-OH基團極性的干擾(參見圖 3-5)。

將矽膠管柱層析收得的部分以 2 毫升 pyridine 做為溶劑回溶，再加入乙酸酐(Acetic anhydride) 1 毫升，微晃，立刻點 TLC 片，在室溫下以 stir bar 攪拌過夜(約 8~12 小時)，並以 parafilm 封住圓底瓶口。之後點 TLC 片確定反應完成，加入 5~7 毫升的水終止反應，以等體積的二氯甲烷(約 10 毫升)萃取 3~5 次，將收得的有機層加入無水硫酸鈉( $\text{NaSO}_4$ )去除水分，接著再利用旋轉蒸空濃縮機使產物乾燥。所收得的乙醯化初萃取物利用矽膠管柱層析進一步去除雜質及水分，以 TLC 片確認所要收得的部分，以旋轉蒸空濃縮機使產物乾燥後收起，打 GC/MS(氣相層析/質譜)分析，並進行之後的銀染層析以分離出單一化合物。

### 三、硝酸銀薄層層析(Silver ion TLC)

取 0.8 g  $\text{AgNO}_3$  溶於 5 毫升甲醇溶液(MeOH)，此溶液配製要避光，將 TLC 片浸在  $\text{AgNO}_3$ /MeOH 溶液中，放在 Hot plate 上約烘烤 15 分鐘至乾，重複三次，以此法製備好的銀染 TLC 片要避光保存。

銀染 TLC 片的展佈方式如同前述 TLC 片的操作。銀染層析的方法多用在脂質的分離，其原理是藉由脂質所含雙鍵的  $\pi$  電子會與銀螯合形成極性複合物，因此，樣品中的化合物所含雙鍵數的多寡及雙鍵位置的不同，會造成極性的差異，可在銀染的 TLC 及銀染的管柱層析分離，進一步將樣品中結構相似的化合物分別純化為單一化合物。

#### 四、硝酸銀矽膠管柱液相色層分析

取 8.6 g  $\text{AgNO}_3$  溶於 50 毫升一次水中，此溶液配製要避光，倒入秤好的矽膠( silica gel ) 25 g 中，以玻棒攪拌均勻，以錫箔紙避光包好放入烘箱  $110^\circ\text{C}$  烘烤約 16 小時。之後將此銀染的矽膠做為管柱層析的固相支持物，其後的步驟同前述的管柱層析方法，但選用乙醚( ether )做為銀染管柱層析流動相的沖提劑。利用銀染 TLC 片及 GC/MS(氣相層析/質譜)確認，將各化合物收在不同的部分。

#### 五、去乙酰化反應 ( Deacetylation of LA fraction )

經銀染方法分出的單一化合物，要利用去乙酰化反應使碳 3 上變回具極性的-OH 基團。取 0.5 g 氫氧化鉀溶於 10 毫升甲醇溶液( 5% KOH in MeOH )，緩緩加入含銀染分出的單一成分化合物的圓底瓶中，在室溫下以 stir bar 攪拌過夜(約 12~16 小時)，並以 parafilm 封住圓底瓶口。點 TLC 片確認反應結束，以旋轉蒸空濃縮機使產物乾燥，理論上產物應只含樣品中的單一化合物(待測物)及醋酸，但發現通常會有氫氧化鉀及甲醇殘留，由於甲醇極性較大，會影響之後矽膠管柱層析的結果，因此，要進行二次矽膠管柱液相層析，才可收得純的單一化合物。打 GC/MS(氣相層析/質譜)確認收到純的單一化合物，將化合物抽氣過夜乾燥，之後送測 NMR(核磁共振)以獲得化合物結構資訊，解出化合物結構。

#### 六、氣相層析/質譜 ( GC/MS )的條件

氣相層析儀使用 Agilent 6890N 型號，管柱選用 Agilent 122-5731 DB-5HT ( 30 m  $\times$  0.25 mm ; 0.1  $\mu\text{m}$  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，10 °C/ min 上升至最終溫度 300 °C，持續 8 分鐘，總時間為 34 分鐘，以質譜( MS )做為訊號偵測器。MS 使用 Agilent Technologies Model 5973 MSD 型號，程式設定為溶劑延遲偵測 7 分鐘，掃描範圍 50 ~ 550，質譜離子供應源溫度設定為 230 °C。

## 2-2-9 建構突變電腦模擬圖

進入 InsightII 分子模擬程式後，在 Molecule 子選單中點選 Get 指令，選擇 pdb 格式，將預備當骨架之人類 OSC 酵素之三維結構點選 Execute 叫出。選擇 Homology 模組，點選 Sequence 子選單的 Extract 指令，即可將人類 OSC 胺基酸序列以令一視窗表示。再用 Sequence 子選單的 Get 指令將待模擬的 OSC 胺基酸序列叫出，選擇 Alignment 將此二胺基酸序列做基本之比對 ( Pairwise\_Sequence )。點選 Modeler 子選單內之 Modeler\_Run 即可取得 OSC 的模擬 3D 結構。

## 第三章 結果與討論

### 3-1 篩選目標

我主要是想要藉由定點突變的技術，探討氧化鯊烯環化酵素表面活性區胺基酸的催化功能，探討其殘基在環化重組機制扮演何種決定性的角色。因此利用 SHC 環化酵素 X-ray 結構為模板，藉由分子模擬的方式尋找 OSC 可能的活性區域位置，再將這些位置的胺基酸突變成丙胺酸，或其他具有特殊意義官能基的胺基酸進行產物分析。實驗室先前已依照此種策略建構了一個突變點基因庫(mutant library)(圖 3-1)，我將這些突變點作為研究氧化鯊烯-羊毛硬脂醇環化酵素催化機制的初步篩選目標，利用質體交換/反向篩選的方式篩選探討哪些 OSC 表面活性區域上的殘基在環化重組機制具有決定性的功能。

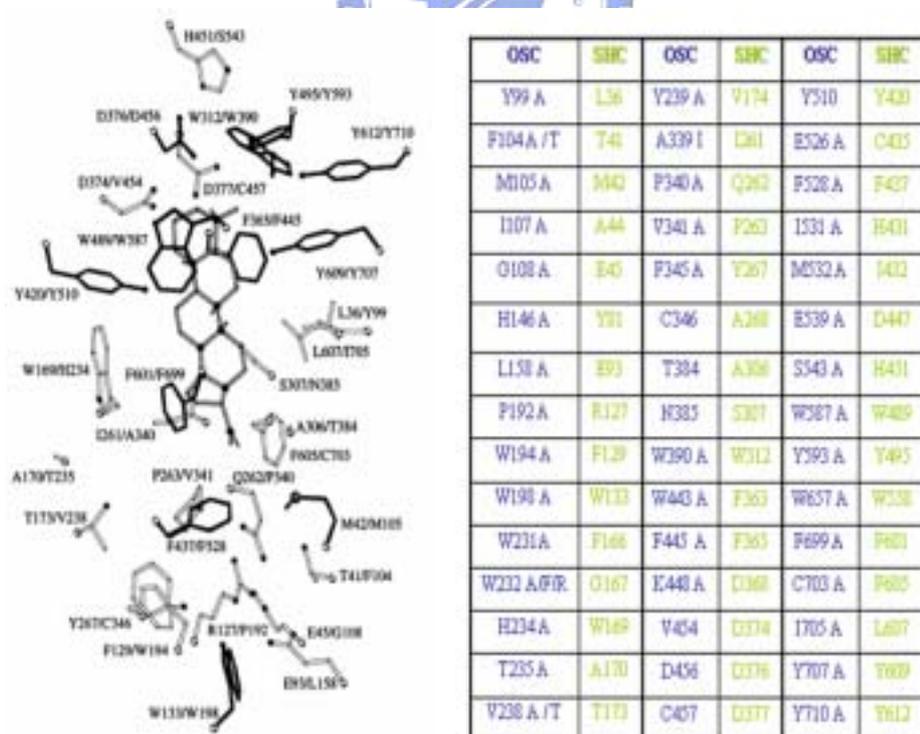


圖 3-1：以 SHC X-ray 結構為模板，分子模擬出 OSC 可能的活性區域位置對照圖，及所建構的突變株

### 3-2 質體交換(Plasmid shuffle)/反向篩選(counter selection)

質體交換為一種有效的篩選方法，主要是將一個帶有野生型基因的質體與帶有突變型基因的質體進行交換作用，利用兩階段的篩選將野生型的質體交換成為帶有突變型的質體(圖)。本實驗室已成功建構出單倍體酵母菌菌株 CBY57 (MATa/ $\alpha$  ERG7 $\Delta$ ::LEU2 *ade2-101 his3- $\Delta$ 200 leu2- $\Delta$ 1 lys2-801 trp1- $\Delta$ 63*[pZS11])，此菌株除含有可供篩選的胺基酸之外，菌體內含質體 pZS11。質體 pZS11 擁有野生型 OSC 基因 ERG7 和 URA3 基因，能夠產生 OSC 活性以彌補酵母菌 CBY57 的缺乏，並可自行合成 Uracil，使得在缺乏 Uracil 也能存活。質體 RS314 是一個穿梭載體(shuttle vector)，可攜帶基因片段轉入酵母菌或大腸桿菌中，此質體上帶有一胺基酸篩選標記基因 *Trp1*。當我們將含突變之 OSC 質體轉入 CBY57，利用 Tryptophan 的選擇性篩選將不含突變點 OSC 質體的酵母菌去除，此時菌體中除了質體 pZS11 之外也含 OSC 定點突變之 RS314 質體。我們利用 pZS11 上的 *URA3* 做為反向篩選(counter selection)的標記基因。Orotidine-5'-Phosphate Decarboxylase 是 *URA3* 基因轉譯的酵素，且是尿嘧啶(Uracil)生合成的重要酵素。當酵母菌中含 *URA3* 基因，培養液中若含有 Fluoroorotic Acid(5'-FOA)，Orotidine-5'-Phosphate Decarboxylase 會將 5'-FOA 轉變成具有毒性的 5-Fluorouracil，使得菌體無法生存，而原本不含 pZS11 的酵母菌，由於 *URA3* 基因已被剔除，所以可在含有 5'-FOA 的培養液中正常生長。當培養液中額外添加 Uracil，酵母菌的正常生長過程中含 *URA3* 基因的 pZS11 質體每代約有 1% 會隨機的失去，而擁有兩個質體的菌體在 5'-FOA 的添加下會全數的死亡。此時我們可篩出只含突變點 OSC 的酵母菌，因此菌體存活與否，則取決於此活性區胺基酸的突變是否對 OSC 催化機制有決定性的影響。若此突變點會破

壞 OSC 的活性，使其無法正常合成麥角固醇(Ergosterol)，而麥角固醇為酵母菌必需的存活因子，若缺乏會導致酵母菌無法存活(圖 3-2)。利用此篩選方式可尋找出對於 OSC 環化重組的機制中有關鍵性功能的胺基酸。

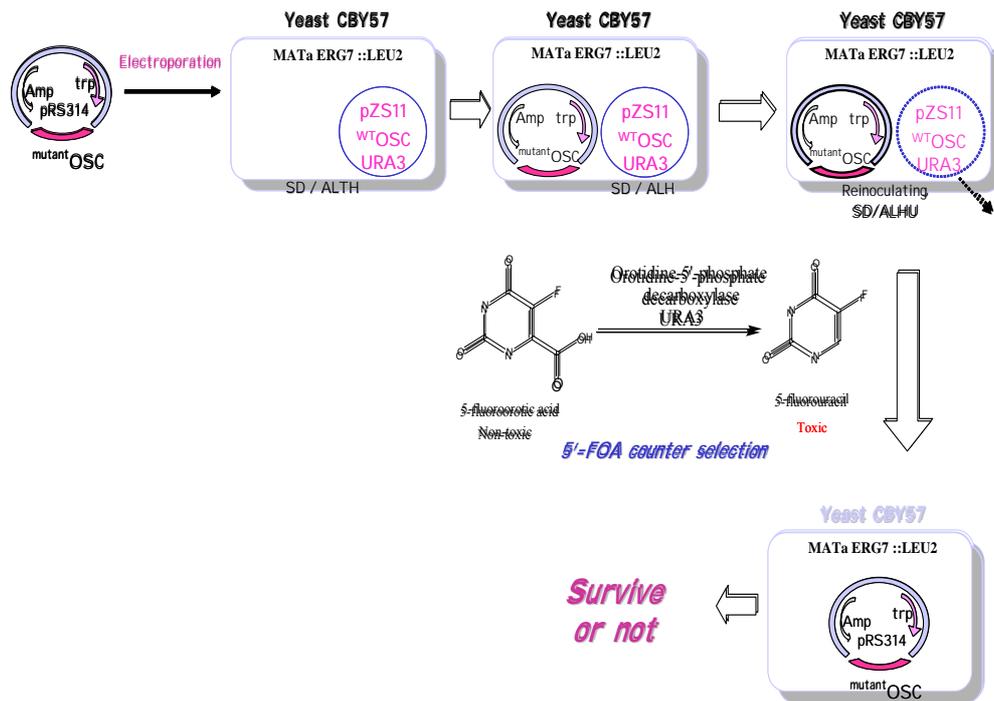


圖 3-2：以質體交換/反向篩選推估突變點在催化的影響性

以 OSC 假設活性區所建構的突變點為材料，進行前述的質體交換/反向篩選，篩選結果(表 3-1)發現有九個突變株無法在 SD+Ade+Lys+Trp+Ura+5'-FOA 的培養皿中生長，但其中 H146A 及 Y707A 二個突變株在培養較長天數後，發現有生長的情形，只是生長狀況較差，初步推論此可能這二個突變點只是輕微地影響了此酵素的功能，又或者此二者對酵素的環化重組機制只是間接的調控或擔任協助的角色。

Mutant site	Restriction Enzyme	Counter selection	Ergosterol complement	TLC、GC-MS analysis
OSC <sup>F104T</sup>	Apa I	Die	Die	--
OSC <sup>H146A</sup>	Sal I	Live	Live	--
OSC <sup>W232A</sup>	Sma I / Xho I	Live	Live	New product
OSC <sup>W232R</sup>	Sma I / Xho I	Die	Die	--
OSC <sup>H234A</sup>	Sma I / Xho I	Die	Die	New product
OSC <sup>M532A</sup>	Pst I	Die	Die	--
OSC <sup>W587A</sup>	Bam H I	Die	Die	--
OSC <sup>F699A</sup>	Cla I	Die	Die	--
OSC <sup>Y707A</sup>	Cla I	Live	Live	--

表 3-1：以 OSC 假設活性區建構的突變點進行質體交換/反向篩選的篩選結果。並且將酵母菌 CBY57 篩出的突變株，轉入酵母菌 TKW14C-2 進行產物分析

由於在 OSC<sup>W232R</sup> 的篩選結果是無法存活，而 OSC<sup>W232A</sup> 可存活，且在 1997 年 Matsuda 在 JACS 發表的研究中提到 W232 可能利用其富含電子特性的殘基(側鏈)<sup>[72]</sup>，藉由碳陽離子- $\pi$  電子效應穩定高能的環化中間物。所以我想利用此二個突變點去驗證質體交換/反向篩選的方法是否為一有效可行的策略。故將此九個突變株轉入另一酵母菌表現系統 TKW14C2 菌株進行產物分析。

TKW14C-2 (*MATa/α ERG7Δ::LEU2 HEM1Δ::G418 ade2-101 his3-Δ200 Leu2-Δ1 lys2-801 trp-Δ63*)是實驗室所建構的一個酵母菌表現系統<sup>[73]</sup>。其不帶有 pZS11 質體，且把原先酵母菌中的 *ERG7* 基因剔除掉，所以不具 OSC 活性，無法自行生成麥角固醇，必須額外補充提供，但發現若只單純剔除 *ERG7* 基因，外界給予麥角固醇補充時，酵母菌不會自行吸收。參照其他的論文<sup>[73]</sup>，發現必須將 *Heme* 基因也一起剔除，酵母菌才可由外界吸收麥角固醇，而 *Heme* 與甲硫胺酸 (Methionine ; Met) 在代謝途徑上有其相關性<sup>[74]</sup>，因此當 *Heme* 基因被剔除，Met 的生合成也會受破壞，故此也要額外補充 Met，因此，把由 CBY57 篩出的突變株，轉入酵母菌 TKW14C-2 做產物分析探討，同時，利用功能性補充的方法再次確認這些突變株是否喪失 OSC 催化功能，由功能性補充篩出的結果同於質體交換的結果(表 3-1)。

我們選擇將突變點 OSC 置入 TKW14C-2 進行產物分析，而不轉入 CBY57 中分析，是因為 CBY57 帶有 pZS11 質體，具有正常的 OSC 活性，假若產物分析的表現系統同時含有突變及正常的 OSC 功能，或許彼此之間會有交互影響，很有可能氧化鯊烯會先被正常 OSC 催化有初步產物，繼而再被突變 OSC 代謝生成非自然界的產物。為了避免這種可能的協同作用影響，故要利用一個沒有正常 OSC 功能的菌株，可以更直接的說明產物是完全由突變效應而造成。

### 3-3 產物分析與探討

篩選出的含定點突變 OSC 基因的酵母菌 TKW14C-2，以 8 L 的 SD+Ade+Lys+His+Met+Ura+Hemin+Ergosterol 培養液培養五~七天，之後將菌體離心下來，約每升可得 4 克菌體重。接著用熱迴流(Reflux)的方式，即利用強鹼高溫打破酵母菌，萃取其中的非皂化脂質，得到粗萃取物後，藉由 TLC 片(薄層層析平板)展佈粗萃取物，用以確認矽膠管柱液相層析(Silica column liquid chromatography)最適的分離條件，並且可概略初步獲知突變點的產物分佈情形(圖 3-3)。

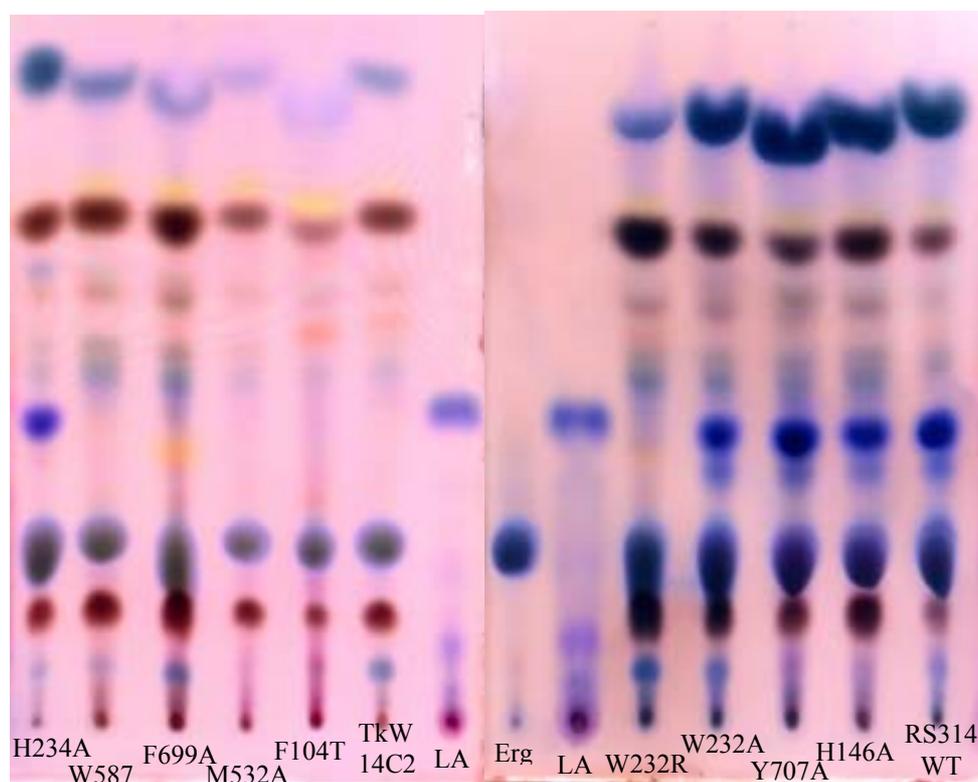


圖 3-3：篩出的九個突變株轉入 TKW14C2 後，以 TLC 片展佈得到初步產物分布

我們利用矽膠管柱液相層析將產物純化分離，分成幾個部分收後，與正負控制組做比對，在 GC-MS 光譜上可發現 OSC<sup>F104T</sup>、OSC<sup>H146A</sup>、OSC<sup>W232R</sup>、OSC<sup>M532A</sup>、OSC<sup>W587A</sup>、OSC<sup>F699A</sup> 與 OSC<sup>Y707A</sup> 其 GC-MS 的圖與控制組的圖譜相似，由這個結果而有以下的初步推論：(1)可能這些位置被改變後，會使環化重組機制完全瓦解，反應受質在突變酵素中不能摺疊成最適的構形以形成碳陽離子中間物；(2)也許因為這些胺基酸的特性因突變而被改變，喪失了原本  $\pi$ -電子穩定高能量中間物，或者影響了開環的起始作用，所以即使反應受質有正確的折疊，也無法使環化反應開始。(3)這些位置的突變可能影響蛋白質的構形，使其失去 OSC 活性而無產物生成。

但我們在 OSC<sup>W232A</sup>、OSC<sup>H234A</sup> 這二個突變株產物分析中，除了有野生型產物羊毛硬脂醇生成之外，還有發現新產物生成。我們利用實驗室既有的標準品，比對 GC 的滯留時間(Retention time)及 MS 的質荷比圖譜，發現 OSC<sup>W232A</sup> 的產物為 Protosta-12,24-dien-3 $\beta$ -01、Lanosterol(LA)、Parkeol(PK)，而 OSC<sup>H234A</sup> 的產物除了前述三者之外，又多了一個新產物 (圖 3-4)。



故此，其後的實驗將分成二個方向進行，其一為解出 OSC<sup>H234A</sup> 新產物的結構，建構 OSC<sup>H234A</sup> 產物圖譜及比例，希望能進一步說明 H234 在環化重組機制所執行的功能。另一方面，OSC<sup>W232A</sup> 有得到除野生型產物外的新產物，與實驗室另一突變株 OSC<sup>H234Y</sup> 有相同的突變產物，但產物比例不同，而 OSC<sup>W232R</sup> 則沒有任何環化產物的生成，因此，我們想針對 W232 這個位置，進行更細部的探討。因而進行了飽和突變( Saturated mutagenesis )實驗，將 W232 此活性區上胺基酸，突變成其他十九種胺基酸，再分別對此十九個突變點利用上述方法進行產物分析，各自建構出產物圖譜與比例，之後滙整在一起並佐以能量最小化的電腦模擬，更深入地探討 W232 此胺基酸殘基在環化重組上的影響。

### 解析 OSC<sup>H234A</sup> 新產物的結構

我們將含 OSC<sup>H234A</sup> 突變質體的 TKW14C2 以 150 L 的培養液 SD+Ade+Lys+His+Met+Ura+Hemin+Ergosterol 大量培養，以一系列的離心、熱迴流破菌、非皂化脂質(NSL)萃取、矽膠管柱層析純化、GC-MS 分析各部分的分離物...等流程，先初步分出 H234A-LA 部分 (fraction)。但利用矽膠管柱層析仍無法將產物個別分離成單一化合物。參考其他論文的方法，發現銀染的 TLC 片及銀染的矽膠管柱層析常被用來分離不飽和脂肪酸及三酸甘油酯、酯類...等脂質衍生物。因此我們嘗試利用與硝酸銀混合的 TLC 片及銀染的矽膠管柱層析將 H234A-LA fraction 進一步分離成單一化合物。對照論文所描述以及從實驗印証出的結果，發現銀染 TLC 的展佈分離與化合物的不飽和度(環數與雙鍵數)、雙鍵位置(環內或環外雙鍵、共軛雙烯或雙烯的

雙鍵位置分開) 具有相關性。飽和脂質無雙鍵，不會與銀螯合形成極性複合物，因此極性最小，展佈後移動至銀染 TLC 片最頂端。當雙鍵數越多，螯合能力愈強，其滯留程度愈大，會在銀染 TLC 片愈下方處，且共軛雙烯滯留程度會比雙鍵分開的雙烯強，以同碳數的化合物環數愈少，雙鍵數愈多滯留程度愈強，雙鍵位置在環內環外也有所不同，環外雙鍵的滯留程度也大於環內雙鍵，會在較下方的位置。

我們以銀染的 TLC 片試出銀染矽膠層析管柱最適化條件，決定分別以 8%、10%、12%、15%、18%、20% 乙醚濃度做為沖提劑，以梯度沖提方式分離產物。但是在進行銀染實驗之前，H234A-LA fraction 的產物要先進行乙醯化反應(Acetylation)，因為這些產物的碳 3 有 -OH 基團，極性大會影響分離效果，所以用乙酸酐(Acetic anhydride)與產物的碳 3-OH 反應，使產物的碳 3 上變成一個乙醯基團(圖 3-5)。

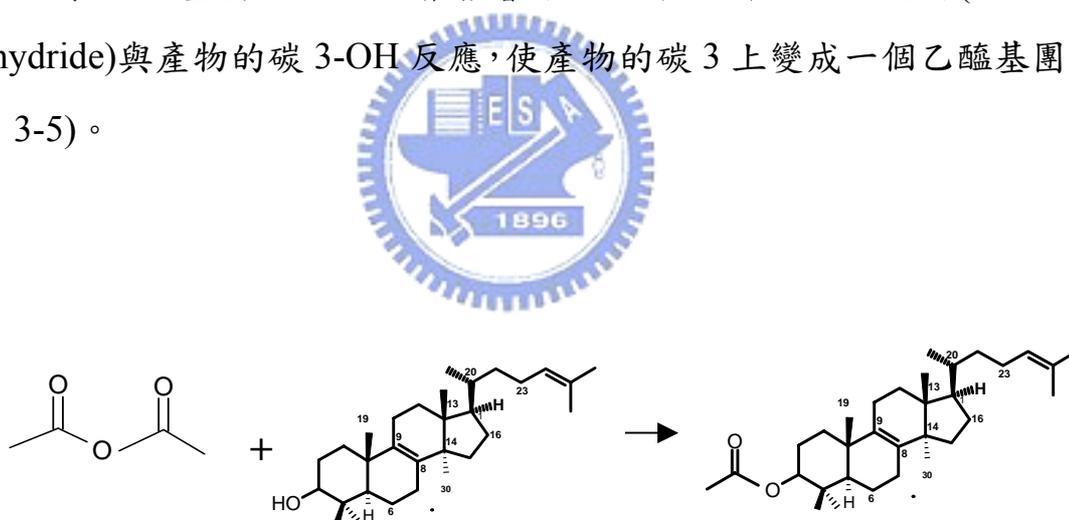


圖 3-5：產物進行乙醯化反應

乙醯化的 H234A-LA fraction 經銀染矽膠管柱層析分離後，成功地純化出個別的單一成分的產物，透過 GC-MS 對照 GC 的滯留時間與 MS 圖譜，可更確認其為我們想分離出的新產物(圖 3-6)。因此我

們再將此新產物進行去乙酰化反應(deacetylation)，使其碳3變回-OH基團，再次以 GC-MS 確認是否與未乙酰化反應前相同。從上述我們可得到純的單一化合物，因此將此新產物送測 NMR，希望能獲得此新產物進一步的結構資訊。透過  $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 、DEPT、HMQC、HMBC、TOCSY、H-H COSY 的圖譜，經交叉比對後，解析出新產物的結構(圖 3-6 ~ 3-11)，並藉由測 1D NOE 確認產物的立體構形。

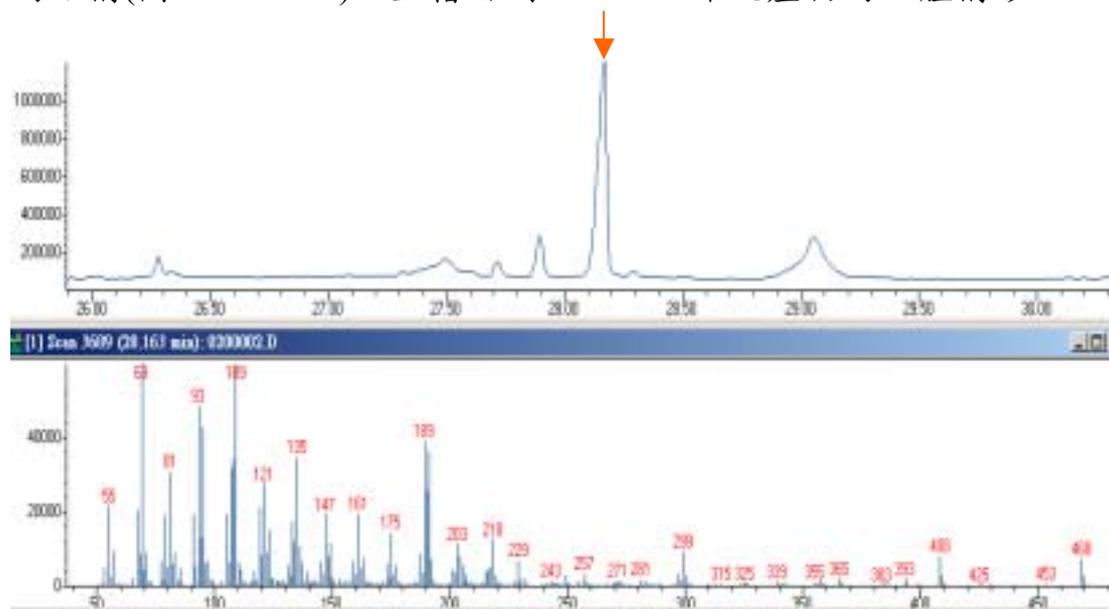


圖 3-6 : GC-MS 確認 H234-unknown acetate 經銀染矽膠管柱層析分離

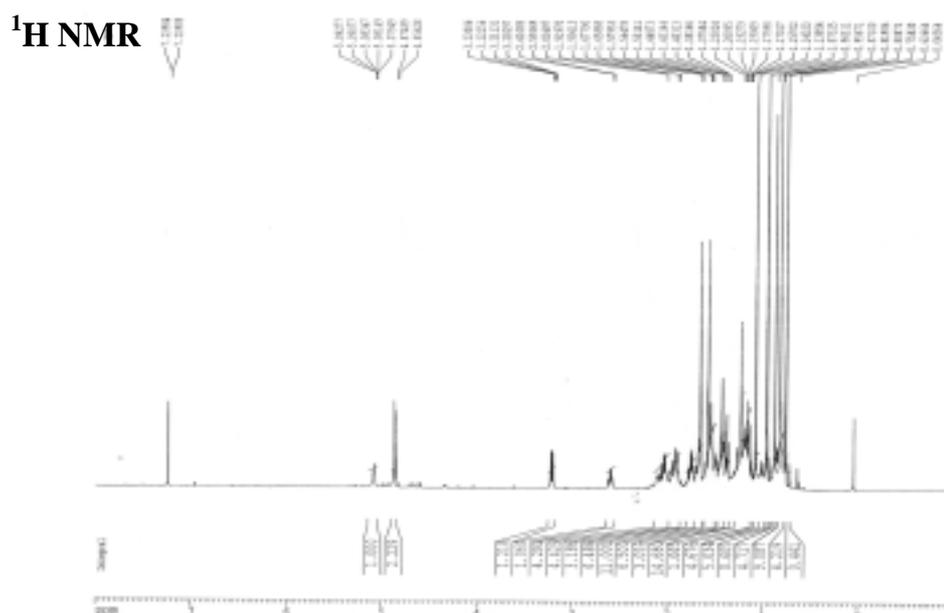


圖 3-7 : H234A-unknown  $^1\text{H NMR}$

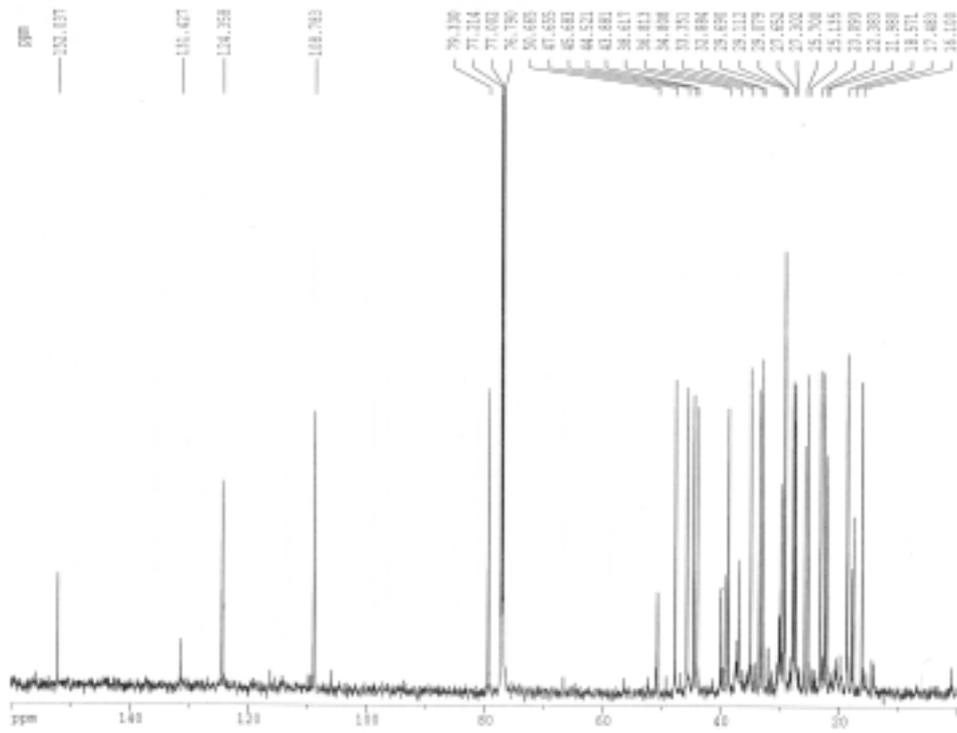


圖 3-8 : H234A-unknown <sup>13</sup>CNMR

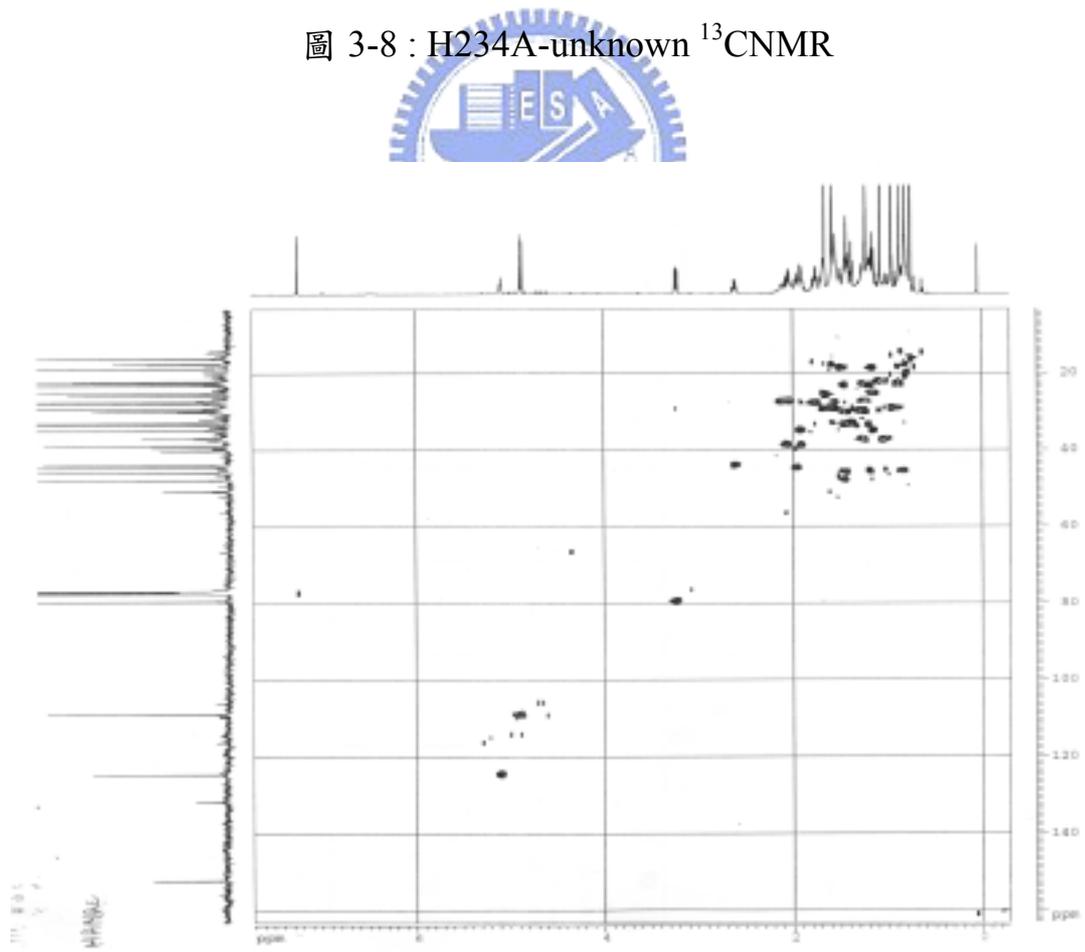


圖 3-9 : H234A-unknown HSQC 圖

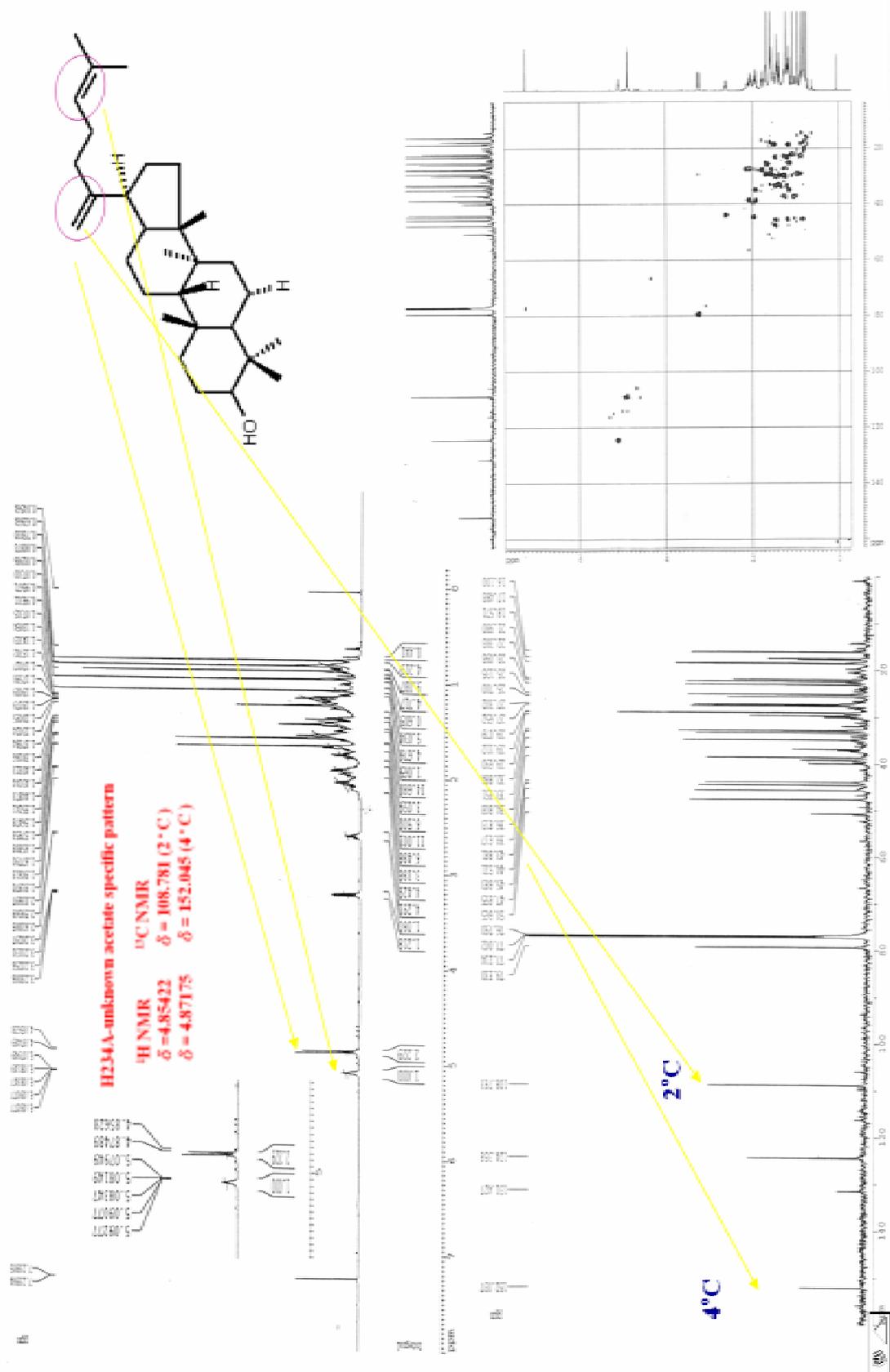


圖 3-10： H234A-unknown 專一的結構訊息

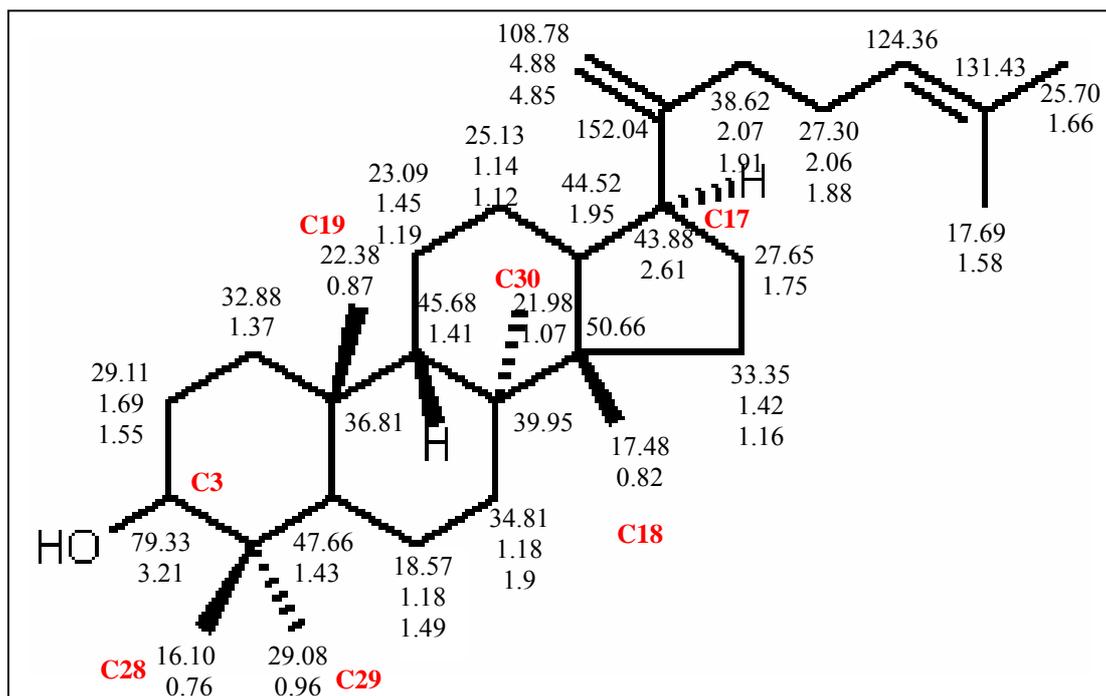


圖 3-11：新產物 Protosta-20,24-dien-3 $\beta$ -01 的結構圖

以 1D NOE 確認產物的立體構形，證明反應是經由 Protosteryl cation 的反應途徑，而不是經 Chair-Chair-Chair 生成 Dammarenyl cation 的反應途徑：

- (1) 測 C19-H 0.87  $\longrightarrow$  可得 0.76 (為 C28-H)、1.41 (為 C9-H)
- (2) 測 C18-H 0.82  $\longrightarrow$  可得 1.41 (為 C9-H)  
、4.85、4.88(此二者為 C21 雙鍵 H)
- (3) 測 C28-H 0.76  $\longrightarrow$  可得 0.96 (為 C29-H)、0.87 (為 C19-H)
- (4) 測 C3-H 3.1  $\longrightarrow$  可得 1.43 (為 C5-H)、0.96 (為 C29-H)
- (5) C18-H 0.82 對不到 C17-H 1.91 ; C30-H 1.07  
C19-H 0.87 對不到 C30-H 1.07

從 OSC<sup>H234A</sup> 突變株的產物分析，我們可發現其均會生成四環產物，代表此位置的官能基即使被改變也不會影響環化作用的形成，且形成的產物差異是在於雙鍵位置不同。因此，由 OSC<sup>H234A</sup> 突變株的產物圖譜我們有一些初步的推論：(1) His234 此位置在機制上可能與 Epoxide 起始開環作用不具相關性，不會直接影響 Asp456 做為 Lewis acid 誘導 Epoxide 開環的作用。(2) 當其殘基由帶有  $\pi$  電子共振及可做為 Lewis base 特性的 imidazole 基團，突變形成無特殊功能的甲基 (-CH<sub>3</sub>) 基團，反應受質在環化形成後的重排重組機制受到改變，反應會在不同碳陽離子中間物停住，繼而脫氫中止反應而有不同的雙鍵位置。從反應停在這些 C20、C13、C8、C9-cation intermediates 可發現，H234 在重排機制上可能是藉由 imidazole 基團所含的  $\pi$  電子共振效應來穩定正常機制上的那些高能碳陽離子中間物，使反應不會被中止而可形成最終的碳 8-碳陽離子中間物，繼而脫氫形成羊毛硬脂醇。所以當 H234 突變成丙胺酸，會喪失了芳香族假說(Aromatic Hypothesis) 中碳陽離子- $\pi$  作用所引導的穩定帶正電高能中間產物的功能，而有此產物多樣性發生。由此突變產物圖譜，我們大膽推論 H234 在環化重排機制上，是利用側鏈含芳香性的  $\pi$  電子共振穩定碳陽離子，繼而促進環化重組機制，而不是以側鏈上 Lewis base 的特性，去吸引其他活性區胺基酸的氫，或與其他活性區胺基酸有氫鍵的拉扯效應，而影響環化重組的反應。我們也可以從酵母菌 OSC 的電腦模擬圖發現，H234 空間位置在 C、D 環的附近，可能因此對 C、D 環有碳陽離子- $\pi$  的穩定作用，故此當 H234 被突變，反應會中止在 C、D 環的碳陽離子而有產物多樣性的生成。

## 3-4 W232 的細部探討

### 3-4-1 由序列比對探討 Trp232 在催化上角色

以序列比對出 OSC、CAS、SHC 活性區胺基酸的對應關係(表 3-2)，可發現 Trp232 不在其假設的活性區上，但若以其演化上親源關係較近的人類 OSC 及阿拉伯芥的 CAS 比對，其對應的為 H.s. OSC Trp230 的活性區位置，以及 A.t Met254 活性區旁的位置。

在催化機制上，CAS 與 OSC 有很相似的環化機制，只有在終止反應時所形成的 C9-碳陽離子中間物的脫氫位置不同，而有產物專一性，推論很有可能是產物 B、C 環間附近的活性區胺基酸的差異所造成的，而 Trp232 是位於產物 B、C 環間附近。一些 CAS 的研究中有提到 CAS His477、Tyr410、Ala469、Ile481、Tyr532 這些位置的突變，有羊毛硬脂醇生成，突變效應使得 CAS 轉變具有 OSC 功能<sup>[75]</sup>。但 CAS 這些突變點的位置均不在以 SHC 為模板建構的 CAS 假設的活性區上，可能位於活性區及受質結合處的鄰近，推論可能這些鄰近活性區及受質結合處的突變，改變殘基空間上的立體障礙及氫鍵拉扯效應，影響其鄰近的活性區胺基酸導致在空間位置上有些許的變化。而比對 CAS 與 OSC 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胺基酸，只有在 OSC Met105、Pro192、Trp231、Phe345 對應的胺基酸不同，在官能基特性有明顯差異，故此，推論這四個殘基位置及其鄰近的胺基酸可能是造成終止反應脫氫位置不同的產物專一性的重要影響點。因此，OSC Trp232 雖然不位於其假設的活性區上，但因鄰近效應而可能在催化機制有一演化上的重要意義。

CAS	OSC	SHC	CAS	OSC	SHC
Y118	Y99 A	L36	W416	W390 A	W312
F123	F104 A / T	T41	W470	W443A	F263
L124	M105 A	M42	F472	F445A	F365
P126	I107A	A44	A475	K448A	D368
G127	G108A	E45	I481	V454	D374
H167	H146A	Y81	D483	D456	D376
L179	L158 A	E93	C484	C457	D377
T215	P192A	R127	Y532	Y510	Y420
W217	W194 A	F129	E548	E526 A	C435
W221	W198 A	W133	F550	F528 A	F437
M254	W231 A	F166	I553	I531 A	H431
W255	W232 A/F/R	G167	V554	M532 A	I432
H257	H234 A	W169	E561	E539 A	D447
C258	T235 A	A170	A565	S543 A	H451
V261	V238 A / T	T173	W610	W587 A	W489
Y262	Y239 A	V174	Y616	Y593 A	Y495
G366	A339 I	I261	W582	W657 A	W558
P367	P340 A	Q262	F726	F699 A	F601
V368	V341 A	P263	C730	C703 A	F605
L372	F345 A	Y267	I732	I705 A	L607
N373	C346A	A268	Y734	Y707 A	Y609
Y410	T384	A306	Y737	Y710 A	Y612
N411	N385	S307			

表 3-2：利用序列比對得出 OSC、CAS、SHC 活性區及重要的鄰近胺基酸的對應表

針對 OSC<sup>W232A</sup> 突變株的產物分析，我們利用實驗室既有的標準品，藉由 GC-MS 的滯留時間及質譜圖比對，將 OSC<sup>W232A</sup> 突變株的產物圖譜成功地建構起來，並藉由所生成的產物，推估出可能進行的環化重組的過程(圖 3-12)。

我們發現 OSC<sup>W232A</sup> 與 OSC<sup>H234Y</sup> 生成的產物相同，均會生成 Protosta-12,24-dien-3 $\beta$ -ol、Lanosterol 及 Parkeol 四環產物，這可能說明 W232 也是藉著陽離子- $\pi$  電子作用去影響催化的機制。當反應受質經酵素催化有最適的摺疊構形環化，在正常的情形下，會環化生成 C20-碳陽離子中間物，之後藉由氫化基(Hydride)轉移，分別生成 C17、C13-碳陽離子中間物，再經過甲基轉移，最後生成 C8-碳陽離子中間物，最後經脫氫反應而產生羊毛硬脂醇。這些高能的碳陽離子中間物，均需要酵素活性區上特定的官能基來穩定之。只有酵素與受質形成一個能量較小、較穩定的複合物時，受質的摺疊環化重排重組才能順利進行。

而當 W232 個胺基酸被改變後，由於突變效應使 Trp 的  $\pi$  電子共振的特性喪失，變為不具功能的-CH<sub>3</sub> 基團，此時陽離子- $\pi$  作用穩定高能碳陽離子的功能也會隨之喪失，因此反應被迫中止在 C11-、C13-碳陽離子而脫氫，因而造成此三個產物的生成。

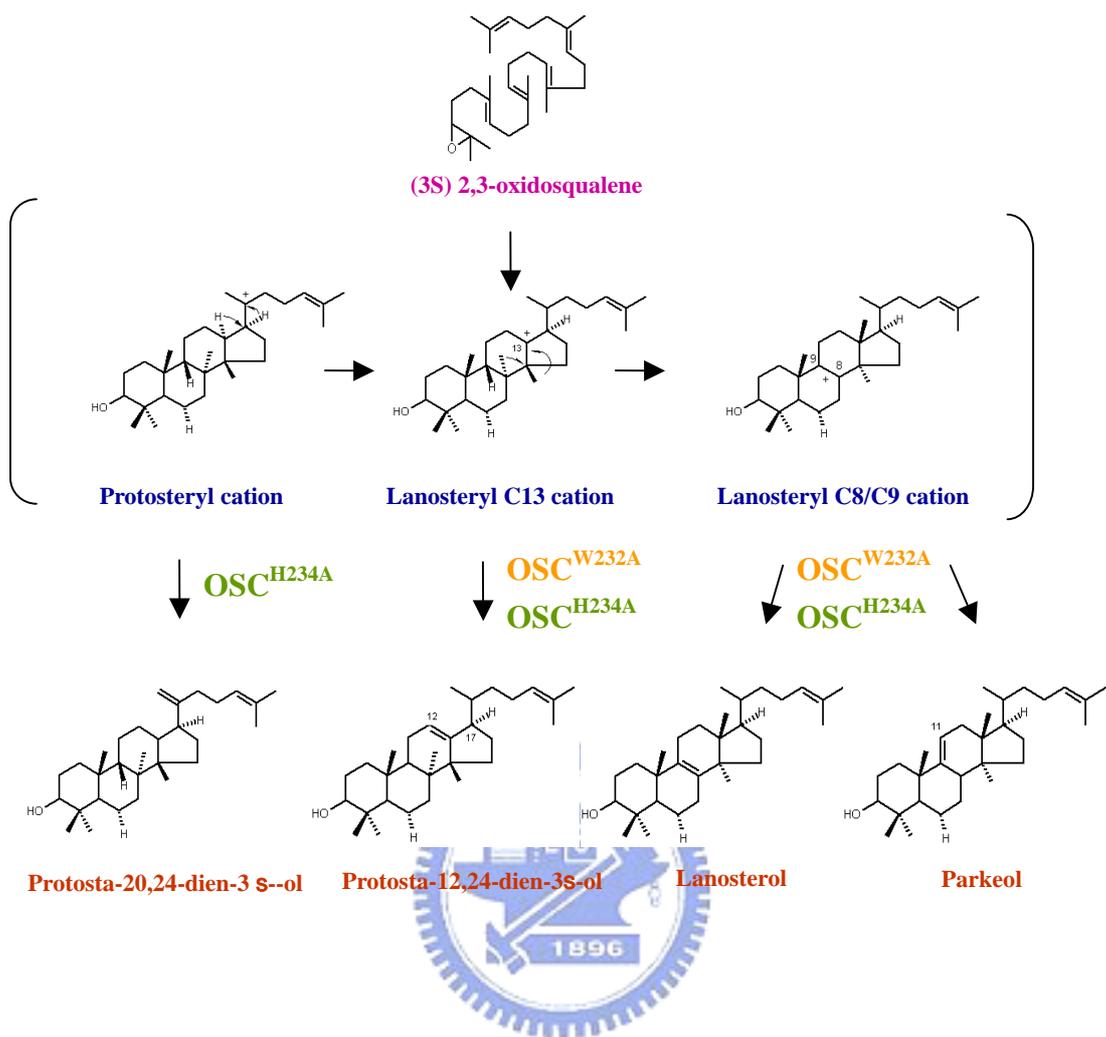


圖 3-12：由產物圖譜分析所推估的 OSC<sup>W232A</sup>、OSC<sup>H234A</sup> 突變株參與的環化重組途徑

在電腦模擬圖中也可發現，H234 空間上的位置比 W232 更靠近產物的環外側鏈處，這正好可以佐証 OSC<sup>H234A</sup> 會在 C20-碳陽離子就被中止反應脫氫，因此比 W232 多了一個新產物的發生(圖 3-13)。

### OSC (wild type)

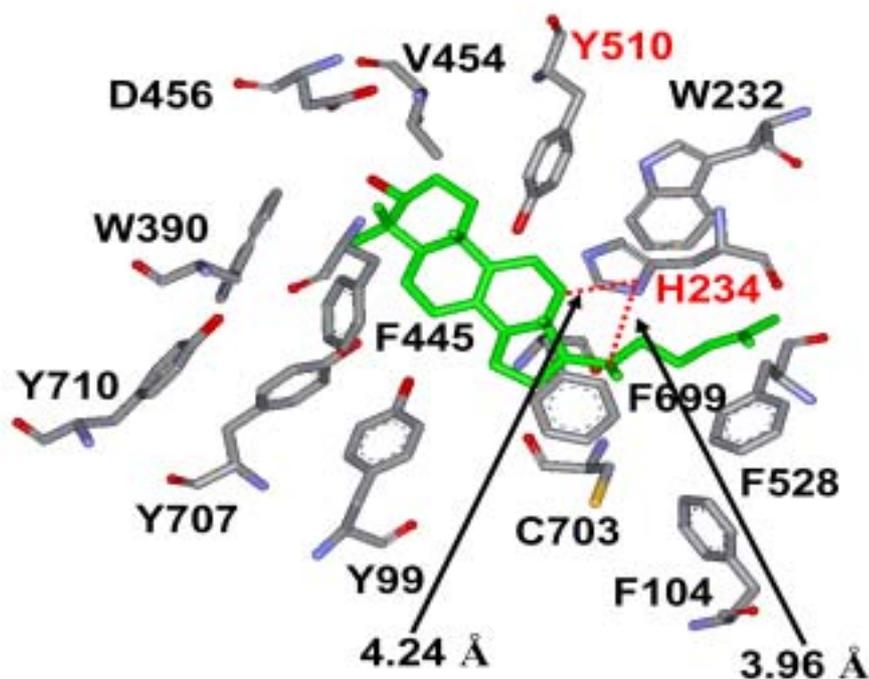


圖 3-13 : Trp232 及 His234 在酵母菌氧化鯊烯-羊毛硬脂醇環化酵素 (OSC)電腦模擬圖中與產物之間的空間關係圖

由於 OSC<sup>W232A</sup>、OSC<sup>H234Y</sup> 有相同的產物圖譜，且在電腦模擬的空間位置上相當靠近，因此針對 W232 進行飽和突變(saturated mutagenesis)實驗，將此位置突變成其他 19 種胺基酸，繼而進行產物分析。一方面探究 W232 與 H234 是否有交互作用影響重排重組的機制，另一方面針對 W232，做更詳細的實驗探討，希望能更進一步建構此位置對環化機制上的影響。

### 3-4-2 W232 saturated mutagenesis 突變株的建構與產物分析

我們主要是利用 Quick change 策略來建構這 19 個突變株，使用的方法列於材料與方法中。當建構好這 19 個突變株之後，曾經定序做更進一步的突變點確認。隨後送入酵母菌 CBY57 進行質體交換/反向篩選，初步了解其對 OSC 活性的影響。再將此 19 個突變點轉入 TKW14C-2 表現，利用功能性互補的方式再次驗證死/活篩選的結果。上述此 19 個突變株的結果列於表 3-3 中。

W232 Mutant Site	Sequence Check	Mutant Base	Enzyme Mapping Check	Applied Strategy	Die / Live Selection	Ergosterol Supplement
W232A	✓	TGG-->GCC	Sma I	QC	Live	Live
W232C	✓	TGG-->TGC	Sma I	QC	Live	Live
W232D	✓	TGG-->GAC	Sma I	QC	Live	Live
W232E	✓	TGG-->GAG	Sma I	QC	Live	Live
W232F	✓	TGG-->TTC	Sma I	QC	Live	Live
W232G	✓	TGG-->GGG	Sma I	QC	Live	Live
W232H	✓	TGG-->CAC	Sma I	QC	Live	Live
W232I	✓	TGG-->ATC	Sma I	QC	Live	Live
W232K	✓	TGG-->AAG	Sma I	QC	Die	Die
W232L	✓	TGG-->CTT	Sma I	QC	Live	Live
W232M	✓	TGG-->ATG	Sma I	QC	Live	Live
W232N	✓	TGG-->AAC	Sma I	QC	Live	Live
W232P	✓	TGG-->CCA	Sma I	QC	Live	Live
W232Q	✓	TGG-->CAG	Sma I	QC	Live	Live
W232R	✓	TGG-->CGG	Sma I	QC	Die	Die
W232S	✓	TGG-->AGC	Sma I	QC	Live	Live
W232T	✓	TGG-->ACA	Sma I	QC	Live	Live
W232V	✓	TGG-->GTC	Sma I	QC	Live	Live
W232W	✓	TGG-->TGG	Sma I	QC	Live	Live
W232Y	✓	TGG-->TAC	Sma I	QC	Live	Live

表 3-3： W232 saturated mutagenesis 突變株建構及功能性互補結果

將此 19 個突變點轉入 TKW14C-2 進行產物分析。個別培養於 2.5L 的 SD+Ade+Lys+His+Met+Ura+Hemin+Ergosterol，經離心、熱迴流破菌、非皂化脂質萃取(NSL extract)得到產物粗萃取物，利用 TLC 片確定矽膠管柱層析的最適條件，並決定粗萃取物該分為哪幾個區間收起。從 TLC 片的結果，決定將死/活篩選 (Die/Live selection) 篩出死的點以 TLC 片上 Achilleol A 位置之前的部分(AA up)、TLC 片上 Achilleol A 至 Ergosterol 出現之前(Mid)、TLC 片上 Ergosterol 出現的位置(Erg)收起，並個別與控制組 TKW14C-2 做對照(也就是不含任何突變質體的酵母菌 TKW14C-2，利用上述方法得到的粗萃取物，以相同的方法分成三部份，做為對照)。而篩出活的點，分成 AA up、TLC 上 Achilleol A 的位置至 LA 位置(AA fraction)、TLC 片上 LA 位置(LA fraction)、TLC 上 LA 位置之下至 Ergosterol 出現前(LA down fraction) 及 Erg 五個部分收起，分別與正負控制組 RS314WT 及 TKW14C-2 做比對(RS314WT 是含正常 OSC 功能的質體，轉入 TKW14C-2 後，依相同方法得到粗萃取物，再以相同方法分成五部分做為對照組。)將上述實驗各區段(fraction)進行 GC-MS 測定以作進一步產物分析。從上述實驗中，19 個突變點有 17 個在 LA fraction 有新產物發現，而有 2 個突變點 OSC<sup>W232R</sup>、OSC<sup>W232K</sup> 的 GC 圖譜與控制組 TKW14C-2 菌株相似，代表沒有產物生成。在比對標準品的 GC 滯留時間及質譜圖，我們可初步建構出 W232 saturated mutagenesis 產物圖譜及產物比例(表 3-4)。

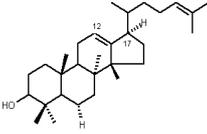
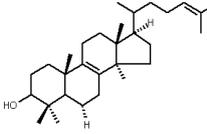
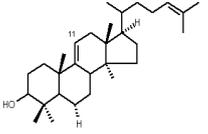
Mutant	26 min	26.5 min	T3 	LA 	PK 
W232F	1.4	1.2	4.3	80.7	12.4
W232D	0.03	1.59	7.81	83.44	7.13
W232G	2.17	1.12	8.11	71.94	16.66
W232S	1	2	10	58	29
W232L	1	1	14	27	57
W232A	2.43	0.74	17.55	45.58	33.7
W232K	No New product				
W232R	Pattern same as the negative control ( TKW14C2 )				
W232C	2.75	0.21	17.51	30.81	48.72
W232V	3.61	0.32	18.55	32.64	44.88
W232E	3	3	13	46	35
W232Q	4	2	23	30	41
W232H	6	2	26	32	34
W232I	7.22	0.73	21.65	30.36	40.04
W232P	3.79	0.79	18.46	46.32	30.64
W232N	1.4	3.5	10.2	56.6	28.3
W232Y	0.34	5.36	3.94	88.84	1.52
W232M	3	4	10	38	45
W232T	2	6	13	57	22

表 3-4：以 GC-MS 的標準品比對建構 W232 saturated mutagenesis 產物圖譜以及利用 GC 算出產物比例

從 W232 飽和突變 (Saturated mutagenesis) 產物圖譜可發現，以矽膠管柱層析分離純化產物，仍無法有效地分出單一化合物，所欲探討的化合物由於在矽膠上有相近的極性，通過液相層析管柱後，大部份仍是無法分開而一起被收至 LA fraction。為了要分離出單一化合物進行新產物的結構解析，利用實驗室之前所建立了銀染矽膠管柱層析、銀染 TLC 片、產物乙醯化及去乙醯化的流程，利用矽膠(silica)與銀螯合的方式改變極性分佈，使 LA fraction 經乙醯化的極性展佈拉大而能有效分離。銀染矽膠管柱層析與銀染 TLC 片的原理方法已在前述的 OSC<sup>H234A</sup> 產物分離提及，於此不再詳述。

GC-MS 建構的產物圖譜，可發現除了 OSC<sup>W232R</sup>、OSC<sup>W232K</sup> 沒有產物生成之外，所有突變株都有 Rt.26 min、Rt.26.5 min 二個未知產物，只是所含量的多寡差異。因此，利用 GC-MS 算出各突變株的產物比例分佈，選取比例最高的突變株培養大量，欲得到足夠量單一成分的未知產物，用以進行 NMR 的結構解析。故而選取 OSC<sup>W232I</sup> 突變株，希望能純化出單一成分的 Rt.26min 未知物。培養 150 升 SD+Ade+Lys+His+Met+Ura+ Hemin+Ergosterol 的 OSC<sup>W232I</sup> 突變株，經由離心、熱迴流破菌、非皂化脂質萃取、矽膠管柱層析分離、GC-MS 初步確認產物分佈比例、LA fraction 乙醯化、銀染 TLC 確認分離的最適條件及未知物分離展佈的順序，銀染矽膠管柱層析分離經乙醯化的產物後，仍無法純化出單一的 Rt.26min 未知物(圖 3-14)。送測 <sup>1</sup>H-NMR 後發現量太少且雜。因此，為了能得到足量 Rt.26min 未知物決定繼續培養至 400L 菌液。

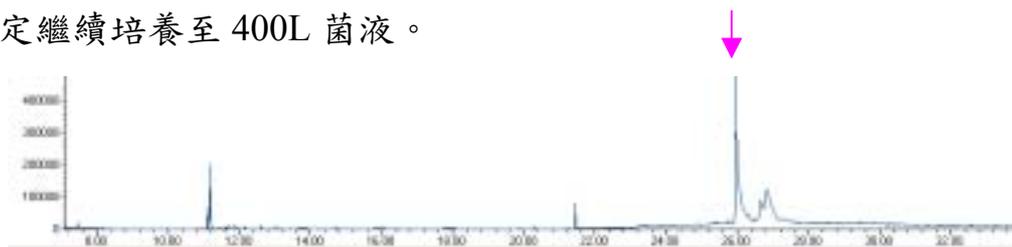


圖 3-14 : 140L W232I-Rt.26 min 未知物通銀染純化送測 NMR 前的 GC-MS

雖然目前無法得到 Rt.26min 未知物的完整結構資訊，但試圖利用 MS 圖譜及銀染 TLC 片獲得一些結構的初步資訊。

### 一. 銀染 TLC 片的產物展佈

從實驗室既有的突變產物及標準品進行銀染 TLC 片產物展佈，我們可得到圖 3-15 的展佈順序。

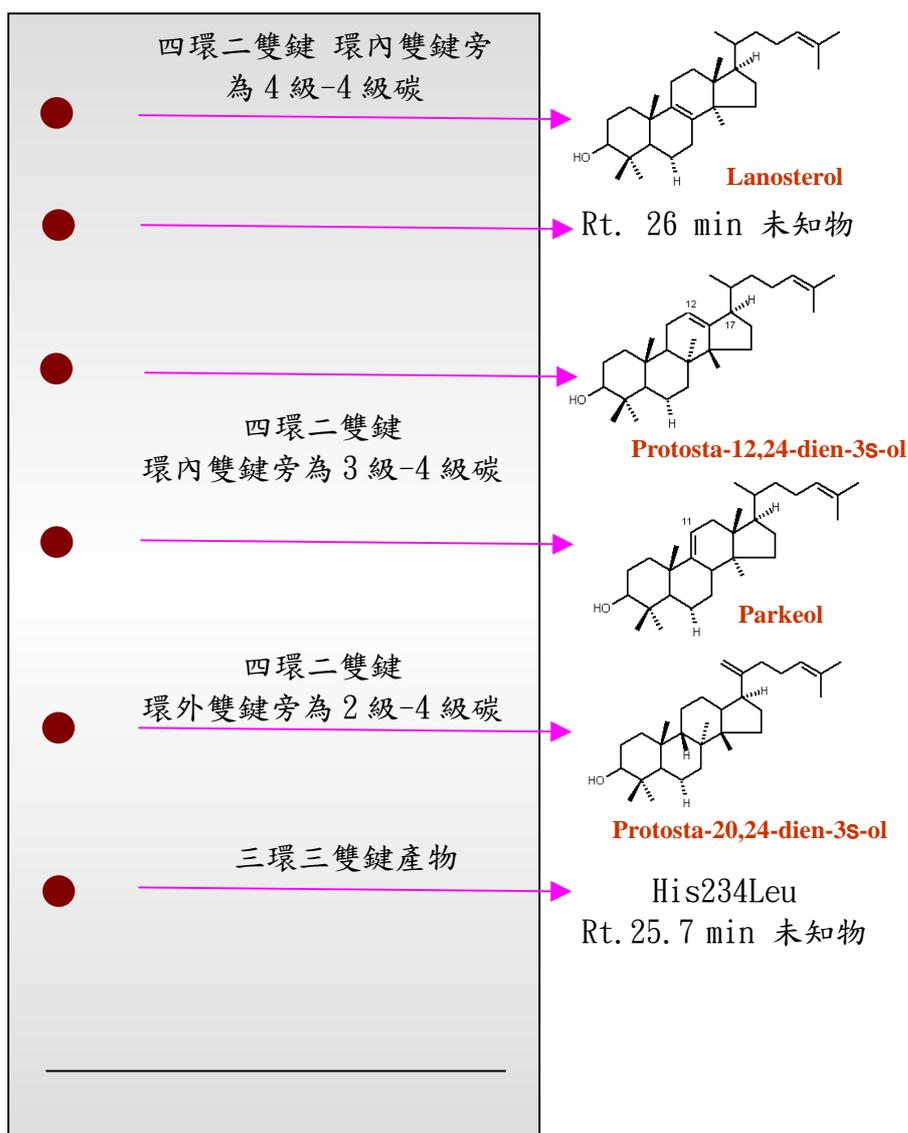


圖 3-15：銀染 TLC 片以乙醚為展開液的產物展佈順序

配合銀染 TLC 片分離的原理，得到以下結論：

(1)同分子量不飽和度愈低(雙鍵數愈少)，滯留程度愈低，在愈上方。

(順序:四環二雙鍵產物 → 三環三雙鍵產物)

(2)雙鍵旁碳級數愈高，滯留程度愈低，在愈上方。

(順序: LA (4 級-4 級碳) → Protosta-12,24-dien-3 $\beta$ -ol、Parkeol (3 級-4 級碳) → Protosta-20,24-dien-3 $\beta$ -ol (2 級-4 級碳))

(3)雙鍵在 5 環-6 環間的滯留程度比雙鍵在 6 環-6 環低，展佈順序在較上方。(順序: Protosta-12,24-dien-3 $\beta$ -ol→Parkeol)

(4)環外雙鍵的滯留程度比環內雙鍵大。

(順序: LA、Protosta-12,24-dien-3 $\beta$ -ol、Parkeol → Protosta-20,24-dien-3 $\beta$ -ol)

而 Rt.26min 未知物在銀染 TLC 片上介於 Lanosterol 與 Protosta-12,24-dien-3 $\beta$ -ol 之間，所以其可能為四環二雙鍵產物，但無法確定雙鍵旁為 4 級-4 級碳或 3 級-4 級碳。

## 二. MS 圖譜的產物解析:

將實驗室有的標準品突變產物及其乙醯化後的產物打入 GC-MS，求得產物的 MS 比對圖(圖 3-17 3-18)

我們可從中得到以下結果及推論:

(1) Parkeol 與 Lanosterol 在 MS 圖上有很近似的圖譜，而其二者結構也相當類似，雙鍵位置只相差一個碳，Lanosterol 為 C8-C9 雙鍵，Parkeol 為 C9-C11 雙鍵且從其他研究中也發現，9 $\beta$ -LA 與 LA 的 MS 圖譜相同，而其二者的結構也很相似，只有 C7-C8 雙鍵與 C8-C9 雙鍵的差異，而我們也發現 Rt.26min 未知物與 Protosta-12,24-dien-3 $\beta$ -ol 有很相似的 MS 圖譜，故而推論 Rt.26min 未知物結構應與 Protosta-12,24-dien-3 $\beta$ -ol 相似，有可能雙鍵位置在

C、D 環之間或 D 環上，而此推論也可與銀染 TLC 片的推論相佐証。

- (2) 對照產物乙醯化前後的 MS 圖譜，可發現經乙醯化後，MS 圖會漂移增加 42，但有些 pattern 不會改變，代表這些 pattern 不包含 A 環，不受 A 環上碳 3 乙醯化反應的影響(圖 3-16)。

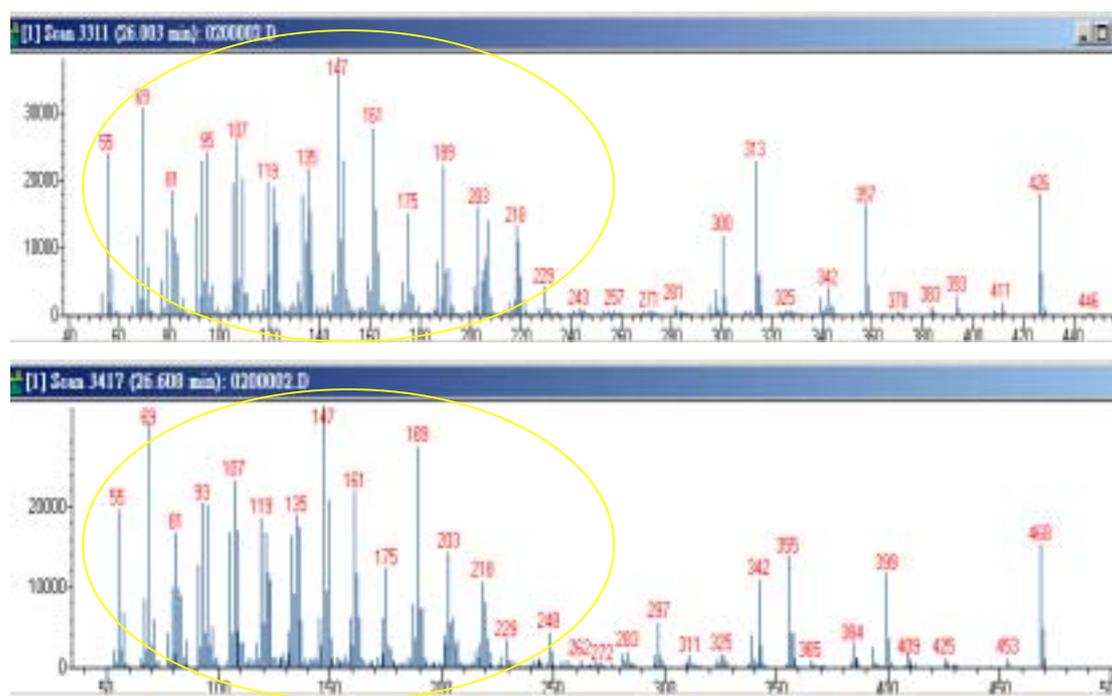


圖 3-16 : Rt.26 min 未知物乙醯化前後 MS 圖

(3) 標準品乙醯化前後的 MS 圖譜對照圖

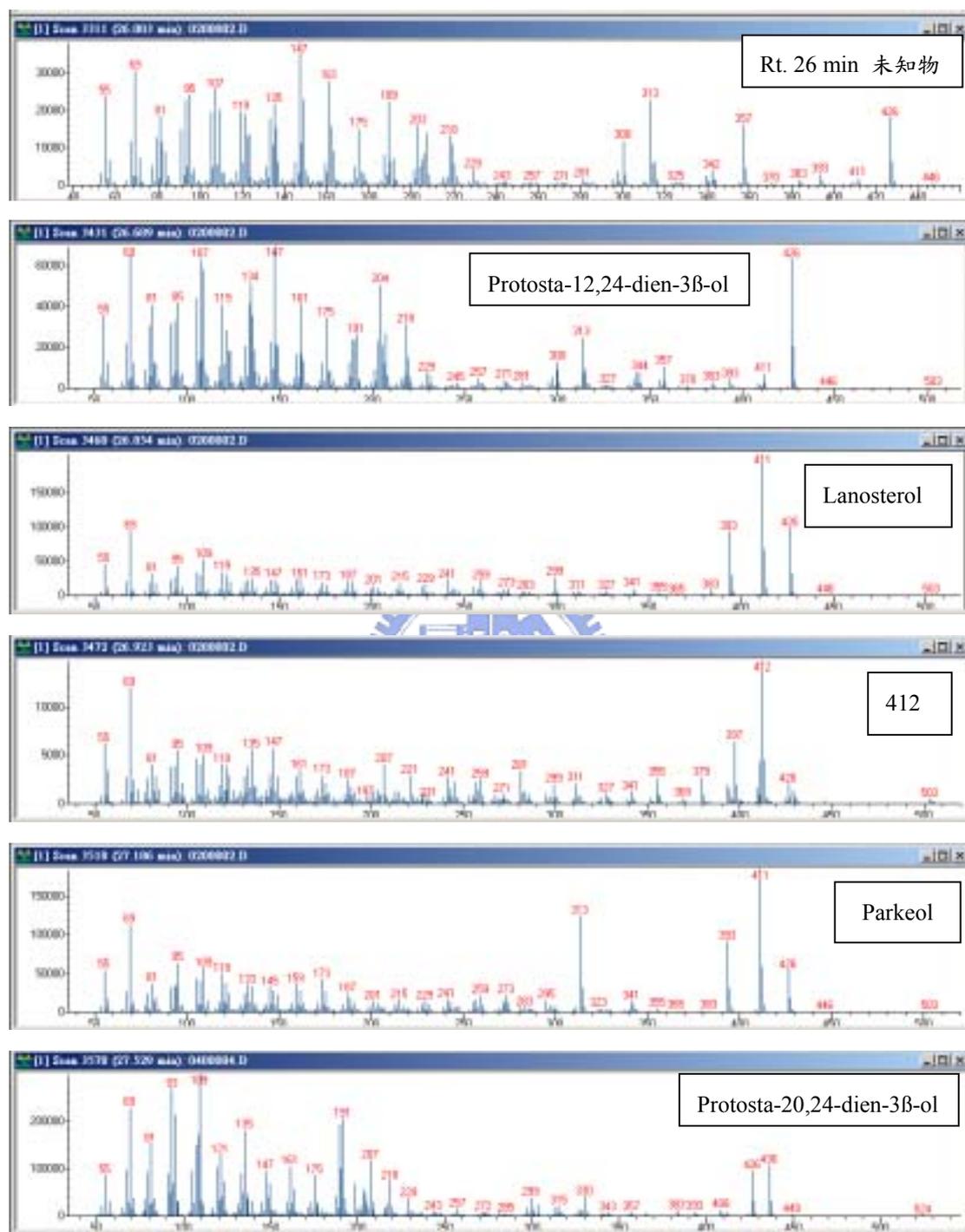


圖 3-17：標準品乙醯化前的 MS 圖譜對照圖

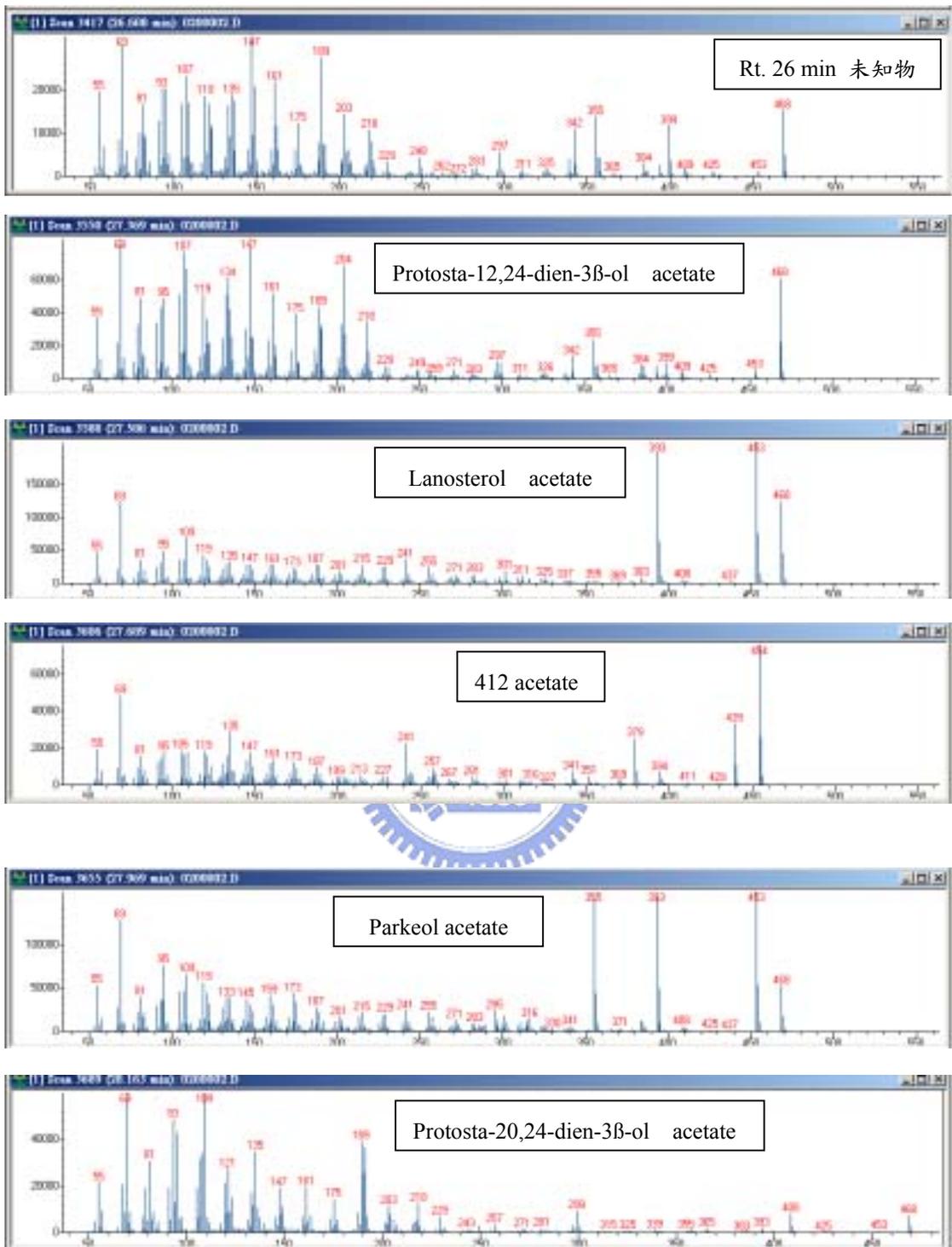


圖 3-18：標準品乙醃化的 MS 圖譜對照圖

- (4)
- Acetylation  
 426 → 468 :M<sup>+</sup> m/Z
- Acetylation  
 411 → 453 :M<sup>+</sup> -CH<sub>3</sub> m/Z 為 411，表示去掉一個甲基
- Acetylation  
 393 → 393 :代表不包含 A 環，為去掉一個甲基及 C3 上的-OH 或-CH<sub>3</sub>COO

(5) 一些已發表論文所提到相似結構物的 MS 圖，我們可佐以解析出一些 Pattern 的位置。

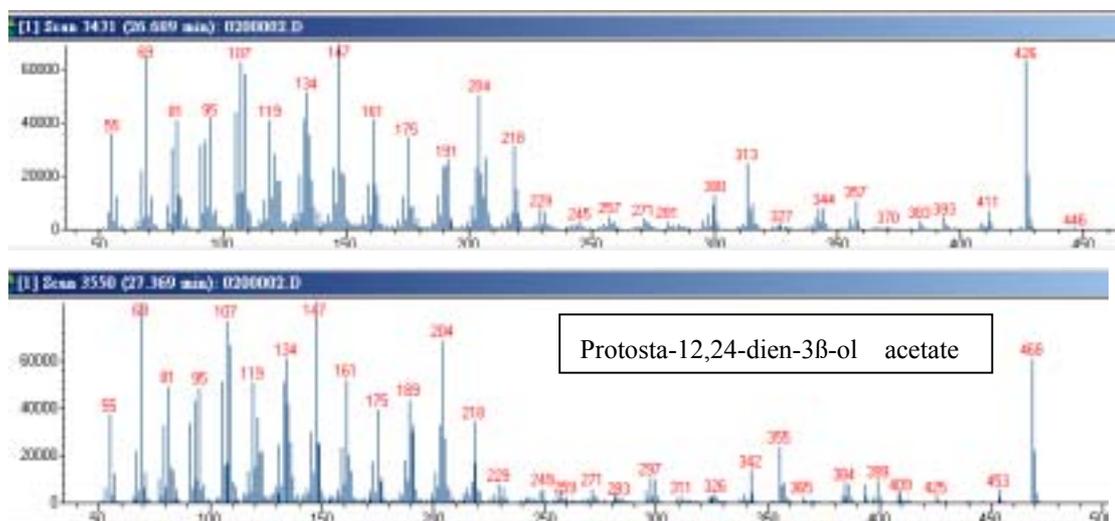
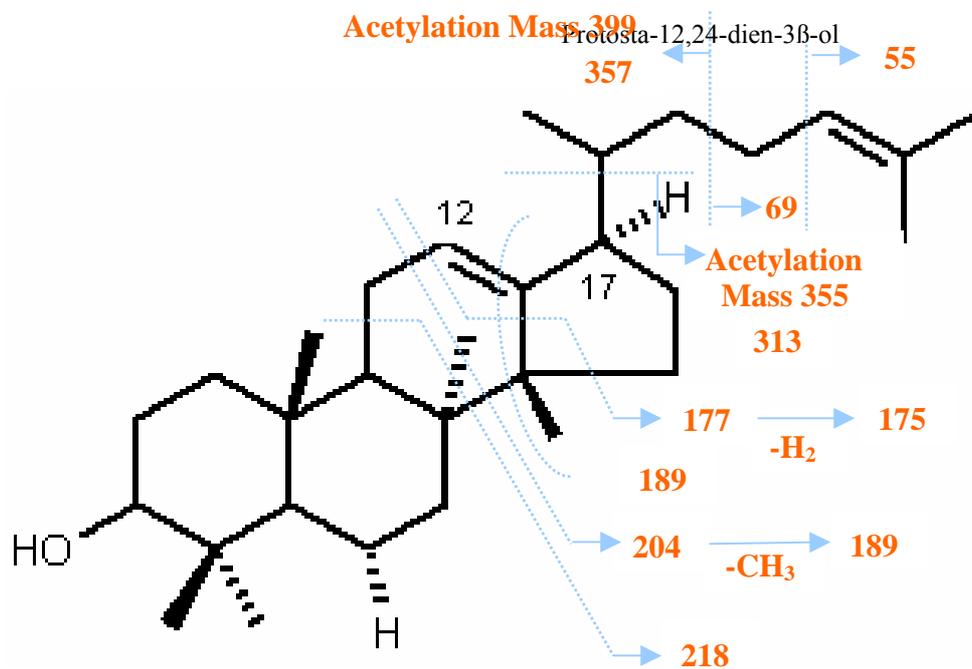


圖 3-19 : Protosta-12,24-dien-3β-ol 乙醯化前後 MS 圖

1. 399 (未乙醯化前為 357) 片段:

在 Rt.26min 未知物的 MS 圖, Protosta-12,24-dien-3 $\beta$ -ol 的 MS 圖, 所佔比例較大, 而 LA 與 PK 為很小根的 397(399-H<sub>2</sub>), 此可說明當雙鍵位置愈靠近環外側鏈, 其異戊二烯單元體的片段愈易被打出, 此結果可進步佐証 Rt.26min 雙鍵應在 C、D 環之間或 D 環的推論。

2. 在 Rt.26min 未知物為 189>203, 以 189 片段的比例較高;而在 Protosta-12,24-dien-3 $\beta$ -ol 是 204>191, 以 204 片段的比例較高。結構理論上應切在雙鍵旁的隔一個碳上, 而 Protosta-12,24-dien-3 $\beta$ -ol 的 MS 符合這個說法, 由此論証, Rt.26min 未知物以 189 為主的片段, 其雙鍵應在 C、D 環之間或 D 環上。

故此, 總結銀染 TLC 及 MS 圖譜的推論, 此 Rt.26min 未知物的結構應為四環二雙鍵產物, 環內雙鍵位置在 C、D 環之間或 D 環上。



在 Rt.26.5 min 未知物的部分，初步先以 MS 圖譜做推論(圖 3-20)。對照單環 Achilleol A、Camelliol C 及四環的 LA、PK 各自的 MS 圖譜上特殊的代表區域，初步推論 Rt.26.5 min 應為四環或五環產物，但結構上進一步資訊須靠純化更多的單一化合物才能獲得。

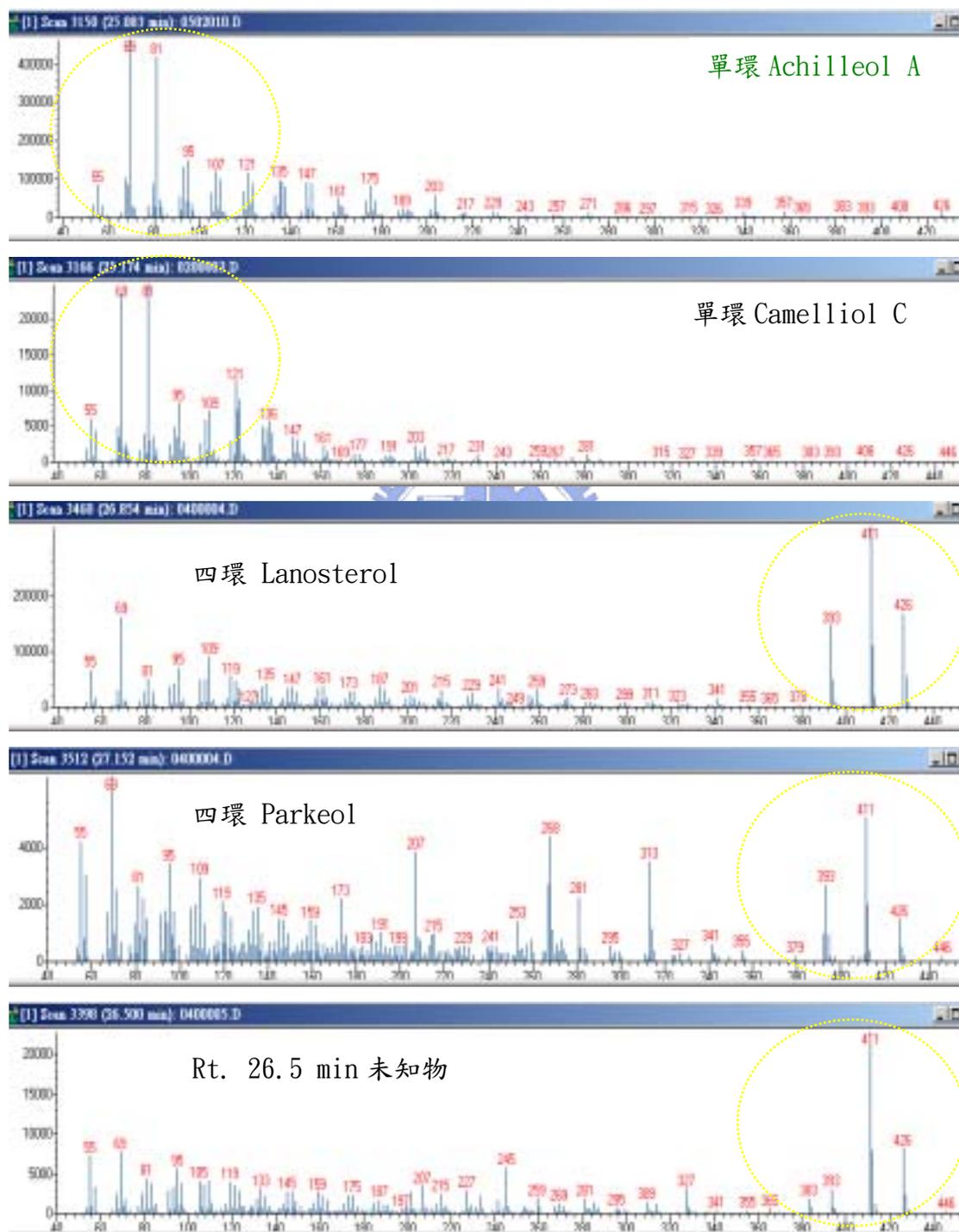


圖 3-20：以已知化合物的 MS 圖譜初步推估 Rt. 26.5 min 未知物的結構資訊

因此，藉由 W232 saturated mutagenesis 產物圖譜分析及上述的推論，可以對此 OSC 之 W232 個胺基酸位置有一些總結的推論：

- (1)W232 主要的作用不是影響 A 環、B 環的形成，其對 Asp456 誘導 2,3-oxidosqualene 開環作用較無影響。
- (2)W232 較不干擾反應受質摺疊的環化過程，也許 W232 與 H234 在環化上有協同作用，同會利用其側鏈上富含電子雲的基團，藉由碳陽離子- $\pi$  電子共振作用穩定反應受質摺疊環化的高能碳陽離子。
- (3)W232 主要影響環化後的重排重組機制，W232 的突變效應會使氫化基、甲基轉移停在不同位置的碳陽離子，繼而脫氫中止反應而有產物多樣性。



### 3-5 藉電腦模擬圖佐証突變效應影響的產物圖譜

將產物圖譜依產物比例分佈概略分為幾類(表 3-5)，利用分子模擬方式探討突變的胺基酸基團對酵素所產生的影響。

Type	Subtype	Mutant	26 min	26.5 min	Protosta-12,24-dien-3 $\beta$ -ol (T3)	Lanosterol (LA)	Parkeol (PK)
Lanosterol 為主產物	Lanosterol 大於 70%	W232Y	0.34	5.36	3.94	88.84	1.52
		W232D	0.03	1.59	7.81	83.44	7.13
		W232F	1.4	1.2	4.3	80.7	12.4
		W232G	2.17	1.12	8.11	71.94	16.66
	產物較平均分布	W232N	1.4	3.5	10.2	56.6	28.3
		W232T	2	6	13	57	22
		W232S	1	2	10	58	29
Protosta-12,24-dien-3 $\beta$ -ol + Parkeol 大於 Lanosterol	Lanosterol 為主產物	W232A	2.43	0.74	17.55	45.58	33.7
		W232P	3.79	0.79	18.46	46.32	30.64
		W232E	3	3	13	46	35
	Parkeol 為主產物	W232L	1	1	14	27	57
		W232I	7.22	0.73	21.65	30.36	40.04
		W232V	3.61	0.32	18.55	32.64	44.88
		W232C	2.75	0.21	17.51	30.81	48.72
		W232M	3	4	10	38	45
		W232Q	4	2	23	30	41
		W232H	6	2	26	32	34
Die / Live selection	Die	W232K	GC pattern 與不含任何 OSC 質體的酵母菌相似,無產物生成				
		W232R					

表 3-5 : W232 飽和突變株依產物比例分布的分類

直接依產物圖譜的比例相關性，將突變株概略的分為三大類而後細分為五類。第一類是會以野生型 OSC 的正常產物為主產物，其下依產物比例分佈再細分成二種，第一種為 LA 產物佔 70%以上，其他產物比例很低約小於 10%；第二種是產物比例較均勻，Protosta-12,24-dien-3 $\beta$ -ol 與 Parkeol 相加的量稍近似於 Lanosterol 的量。第二類是 Protosta-12,24-dien-3 $\beta$ -ol 與 Parkeol 相加的量大於野生型 OSC 正常產物 Lanosterol 的量，其下細分為 Lanosterol 為主產物或是以 Parkeol 為主產物二種。第三類是完全沒有產物生成的突變點，其 GC 的產物圖譜與所使用的菌株 TKW14C-2(不含突變質體及正常 OSC 功能)的 GC 圖譜是相似的，沒有任何環化產物出現。而利用電腦模擬技術，以目前 2004 年 Thoma 在 Nature 發表的人類 OSC X-ray 結構為模板<sup>[76]</sup>，以序列比對方式模擬出酵母菌 OSC 的結構，再分別算出突變後的殘基，在空間上與各碳陽離子中間物的距離，探討是否因突變點殘基空間位置的交互作用，使環化後氫化基、甲基轉移，會停在某一碳陽離子中間物而脫氫(deprotonation)中止反應，形成此產物多樣性。

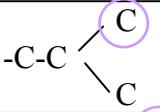
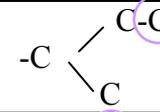
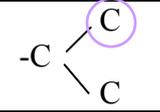
Mutant	Side chain	C9	C11	C12	C13
Trp 232	Indole N	6.69	5.38	5.71	7.1
Trp 232 Tyr	Phenolic group -OH	5.03	3.98	4.51	6
Trp 232 Asp	Carboxyl group -O	7.89	6.49	6.6	7.88
Trp 232 Phe	Benzene group -C	6.26	5.19	5.11	6.62
Trp 232 Gly	-H	11.28	9.9	9.98	11.22
Trp 232 Asn	Amide group -C=O	8.09	6.67	6.75	7.99
Trp 232 Asn	Amide group -NH <sub>2</sub>	7.99	6.65	6.65	8.08
Trp 232 Thr		10.8	9.44	9.32	10.68
Trp 232 Ser		10.25	8.9	8.85	10.23
Trp 232 Ala	-C	9.86	8.46	8.45	9.76
Trp 232 Pro	Imino group -C	9.95	8.55	8.57	9.87
Trp 232 Glu	Carboxyl group -O	7.93	6.51	6.03	7.32
Trp 232 Leu		7.61	6.2	6.25	7.59
Trp 232 Ile		8.01	6.74	6.8	8.26
Trp 232 Val		8.19	6.76	6.69	7.98
Trp 232 Cys	-C-SH	8.23	6.82	6.8	8.2
Trp 232 Met	-C-S-C	7.66	6.29	6.08	7.47
Trp 232 His	Imidazole -N	6.5	5.05	4.88	6.22
Trp 232 Gln	Amide group -C=O	9.09	7.78	7.52	8.92
Trp 232 Gln	Amide group -NH <sub>2</sub>	7.06	5.81	5.86	7.35
Trp 232 Lys	-εC-NH <sub>2</sub> <sup>+</sup>	7.18	5.96	5.52	6.9
Trp 232 Arg	共振 -N	6.33	5.08	4.87	6.33

表 3-6：突變點側鏈上胺基酸基團與各碳陽離子中間物的距離

但是利用電腦演算突變殘基與產物的空間相關性，發現空間上的距離相當大，似乎沒有一個有力的佐証關係(表 3-6)。突變點側鏈基團距 C-9、C-11、C-12、C-13 碳陽離子距離，似乎無法對突變產物有一清楚解釋。且空間距離遠，距離與產物分布似乎沒有一個直接相關性，因此初步懷疑 Trp232 並不是藉胺基酸側鏈對環化、重排重組機制有直接影響，可能是藉氫鍵拉扯效應與鄰近的胺基酸有交互作用，又或透過水分子與反應受質有交互影響。故此，先以產物分佈的比例與胺基酸側鏈基團的特性，作相關的討論描述(電腦模擬圖見附錄)。

(一) LA 為主產物大於 70%，其他產物分佈很少。

主要有 OSC<sup>W232Y</sup>、OSC<sup>W232D</sup>、OSC<sup>W232F</sup>、OSC<sup>W232G</sup> 四個突變株。

在先前的一些定點突變研究中，Trp232 被認為是藉側鏈富含電子的特性，穩定反應受質環化過程中所生成的帶正電高能碳陽離子中間物，使得環化後的重排重組機制能順利進行，不致於因能量上的不傾向而使環化的反應過程被截斷。

(1)因此，我們發現當 Trp232 突變成相似的胺基酸基團特性 Tyr 及 Phe 時，其產物的分布無太大改變，LA 的比例佔 80%以上。此結果符合 Griffin 的 Aromatic Hypothesis 理論模組，更進一步說明 Trp232 的確是扮演穩定高能中間物的角色。

(2)當 Trp 突變成 Asp，LA 比例也在 80%以上，其餘產物分布都小於 10%，此結果符合 Johnson Model 的假說，很有可能 Asp 利用其側鏈帶有負電的胺基酸來穩定高能中間物，使得 OSC<sup>W232D</sup> 突變前後的功能沒有太大的改變。

(3) OSC<sup>W232G</sup> 的 LA 產物略低約為 70%左右，而 Parkeol 產物比例增加，透過 OSC<sup>W232G</sup> 與野生(wild type) OSC 的電腦模擬圖對照，認為 OSC<sup>W232G</sup> 原本會利用其芳香族基團，與 His234 富含

電子的側鏈，有協同作用去穩定高能碳陽離子中間物。且側鏈 indole 環有較大的立體空間特性，會壓迫 His234 靠近高能碳陽離子中間物的碳 8/碳 9，使得脫氫中止反應有一正確的定位機制，而能在碳 8/碳 9 間脫氫生成 LA。故此，當 Trp 突變成 Gly，其立體空間的壓迫消失，His234 位置有漂移現象，且其富含電子的芳香族基團特性消失，His234 的協同穩定高能碳陽離子作用被減弱，故此，Parkeol 產物比例增加。而 LA 因協同作用減弱，使比例降至 70%。此立體空間壓迫的定位作用之推論，也可用以解釋 OSC<sup>W232Y</sup>、OSC<sup>W232F</sup>、OSC<sup>W232G</sup> 依序在 LA 產物比例及 Parkeol 比例有一遞減和遞增的趨勢。

(4)在此也想利用電腦模擬圖解釋為何同屬於酸性胺基酸的 Asp 與 Glu，在產物的比例分布會有如此大的差距，Asp 的 LA 產物比例將近為 Glu 的二倍。由於先前有研究指出，Tyr510 與 His234 有氫鍵的交互作用，藉著氫鍵拉扯效應，使 His234 有一正確的定位。

<1>.當 His234 有正確的定位時，可利用碳陽離子- $\pi$  電子共振穩定鄰近的高能碳陽離子中間物。

<2>.可做為 Lewis base。當其有正確的定位，可藉著其鹼基團特性，捕抓碳 8/碳 9 的氫，協助脫氫作用中止反應，形成產物 LA。或是透過鄰近的水分子的氫鍵作用，協助碳 8/碳 9 的脫氫作用。

而從 OSC<sup>W232D</sup> 及 OSC<sup>W232E</sup> 的電腦模擬圖(電腦模擬圖見附錄)，與突變前的 Trp232 比較，發現在 OSC<sup>W232E</sup> 的突變點，His234 會被拉扯靠近 Glu。此可能也與 Asp、Glu 側鏈上碳鏈的長短有關。由於 Asp 比 Glu 側鏈少一個碳，

在空間上距 His234 較遠，不影響 Tyr510 與 His234 間氫鍵的拉扯效應而使 His234 能有正確的定位，而 OSC<sup>W232D</sup> 只是單純的經由其帶負電的胺基酸基團，穩定環化過程的高能中間物，還是能稍微替補原先 Trp232 的功能。但是 OSC<sup>W232E</sup> 在電腦模擬圖中顯示與 His234 有空間的交互影響，可能 Glu232 與 His234 之間有較強的氫鍵拉扯效應，減弱了 Tyr510 與 His234 之間的氫鍵交互作用，使得 His234 位向偏離碳 8/碳 9，而較不易在碳 8/碳 9 間協助脫氫作用而生成 LA。故而 LA 產物比例減少，其他次產物的生成相加超過 LA。

(二) LA 為主產物，其他次產物的比例較平均分布。

主要有 OSC<sup>W232N</sup>、OSC<sup>W232T</sup>、OSC<sup>W232S</sup> 三個突變株。LA 產物比例約在近 60%，而 Protosta-12,24-dien-3 $\beta$ -ol 及 Parkeol 比例均增加，各增加至 10%及 20%左右。

(1) OSC<sup>W232D</sup> 與 OSC<sup>W232N</sup> 之間，二者只有側鏈上所帶的羧酸基團與醯胺基團差異，二者的產物比例分布就有很大的差異性存在。以 OSC<sup>W232D</sup> 及 OSC<sup>W232N</sup> 及未突變的 Trp232 電腦模擬圖來探討(電腦模擬圖見附錄)，發現 OSC<sup>W232D</sup> 與 OSC<sup>W232N</sup> 在空間上的位置、側鏈的長短、距反應受質的距離、與酵素上鄰近基團的分布均沒有很大的差異存在。但從電腦模擬圖中發現，OSC<sup>W232D</sup> 可能藉著側鏈上的酸性基團與 Phe454、Lys448 有交互影響。可觀察到在產物 A 環附近的 Phe454、Lys448，似乎有空間上的壓迫(constriction)而糾結的形態。因此，推估認為 Phe454、Lys448 可能位於構形上可變動的區域，當 Trp 突變成 Asp，似乎會將

Phe454、Lys448 有一”束緊”的現象，二者在空間上的緊縮壓迫反應受質往 Tyr510 His234 飄移，使得雖然失去 Trp232 原先的空間立體壓迫至 His234 能正確定位在碳 8/碳 9 間，但在 Phe454、Lys448 壓迫反應受質的作用下，藉 Tyr510 與 His234 的氫鍵拉扯效應，His234 仍能有效定位於碳 8/碳 9 間協助脫氫作用，而使反應中止產生 LA。

但是當 Trp 突變成 Asn，其側鏈上的醯胺基團對 Phe454 與 Lys448 沒有此種誘導作用，只能利用 Tyr510 與 His234 間的氫鍵拉扯效應，使得 His234 空間位置偏移，對碳 8/碳 9 有較弱的脫氫效應，His234 位置可能偏移至碳 11、碳 13 附近，繼而穩定重排重組時的形成的 C-13 碳陽離子中間物，可能在碳 11 及碳 13 附近有脫氫的中止反應發生，因而使 Parkeol 及 Protosta-12,24-dien-3 $\beta$ -ol 的產物比例增加。

- (2) 對照 OSC<sup>W232T</sup>、OSC<sup>W232S</sup> 與 OSC<sup>W232M</sup>、OSC<sup>W232C</sup> 的產物分布，發現二者在側鏈基團有相似特性，只是含氧原子與硫原子的差異，但在產物的比例分布就有很大的差異性。OSC<sup>W232T</sup>、OSC<sup>W232S</sup> 以 LA 為主產物，次產物相加仍少於 LA 主產物；而 OSC<sup>W232M</sup>、OSC<sup>W232C</sup> 以 Parkeol 為主產物，Protosta-12,24-dien-3 $\beta$ -ol、LA 與 PK 三個產物之間的比例較均勻分布。透過比例此四個突變點及未突變 Trp232 的電腦模擬圖，推論認為<1>含硫的側鏈基團，因硫原子較氧原子造成較大的立體障礙，使其在空間位置較靠近 His234，使得 His234 更偏離原先的催化反應受質的位置，使得 Protosta-12,24-dien-3 $\beta$ -ol 及 Parkeol 的產物比例增加，呈現較均勻的比例分布情況。<2> OSC<sup>W232C</sup> 的-SH 側鏈相較於

OSC<sup>W232S</sup> 的-OH 基團，有較酸的特性，透過-SH 的氫在 Tyr510 及 His234 彼此間的轉移作用，會把 Tyr510 拉扯過來(與 OSC<sup>W232T</sup>、OSC<sup>W232S</sup> 模擬圖的 Tyr510 位置的比較)，當 Tyr510 偏離原先的催化位置，連帶影響了與 His234 間的交互作用，Tyr510 與 His234 往反應受質的外側偏移，會影響環化反應酵素內部不同位置的碳陽離子生成，繼而協助不同位置的脫氫作用中止反應，因而有雙鍵位置不同的產物，且有產物比例分布較均勻的現象產生。

(三) Protosta-12,24-dien-3 $\beta$ -ol 與 Parkeol 的產物比例相加大於 Lanosterol。此類突變株為最多的一類，產物的比例呈現較均勻的分布。

(1)支鏈胺基酸(Branch chain amino acid)的突變株均屬於此類。

推論可能由於此類胺基酸只是藉著含碳的側鏈而有立體空間上的特性。但是相對於 Trp232 未突變前，有更大的立體空間效應去壓迫 His234，使其定位在正確位置而參與催化反應的最終脫氫作用。因此，當 Trp 突變成澆基支鏈胺基酸，空間壓迫的效應減小，His234 會往反應受質的外側偏移，而使最終的脫氫位置有所不同。由於此空間偏移的傾向性，促使產物比例有均勻的分布。

(2)當 Trp232 突變成 His，會使得 Tyr 與 His 之間的氫鍵拉扯效應更大，Trp232His 突變點在此 Tyr510-His232 及 Tyr510-His234 的雙重氫鍵拉扯效應下，Tyr510 及 His234 會更往反應受質外側偏移，造成 Protosta-12,24-dien-3 $\beta$ -ol 與 Parkeol、Lanosterol 有近似 1:1:1 的產物比例產生。

(四) 功能性互補實驗為死的突變點。

為 Trp 突變成 Lys 或 Arg 二個突變株。在產物分析上發現與原本不含任何 OSC 質體的酵母菌一樣，代表沒有產物生成。故此推論

- (1)當原本富含電子的 Trp 突變成具正電的鹼性胺基酸，可能會因對高能帶正電的環化中間物有電荷斥力，使得環化中間物不穩定而無法形成，阻礙了 OSC 環化反應的進行。
- (2)Arg、Lys 帶正電的特性，可能會使 OSC 無法摺疊(folding)，喪失正常的蛋白質構形而無法催化環化反應。

故此，總結上述的推論，認為 OSC Trp232 可能是利用其富含電子的側鏈，與其鄰近的 His234 協同穩定環化反應過程中產生的高能碳陽離子中間物。並且因 Trp 側鏈較大的立體空間特性，協助 His234 正確定位，對環化反應終止的脫氫步驟有輔助的功能。以及與酵素上鄰近基團 His234、Tyr510 有氫鍵拉扯的交互作用。

### 3-6 OSC<sup>Trp232Ala/His234Ala</sup>、OSC<sup>Trp232Ala/Tyr510Ala</sup>、 OSC<sup>Trp232Ala/Tyr510Lys</sup>、OSC<sup>His234Ala/Tyr510Ala</sup> 雙點突 變產物分析

雖然從電腦模擬圖中推論 Trp232 與酵素上鄰近基團 His234、Tyr510，在環化機制中有協同的催化影響，但還是希望能透過實驗，進一步清楚闡明其在催化機制上確有協同的催化效應，因此建構了 OSC<sup>Trp232Ala/His234Ala</sup>、OSC<sup>Trp232Ala/Tyr510Ala</sup>、OSC<sup>Trp232Ala/Tyr510Lys</sup>、OSC<sup>His234Ala/Tyr510Ala</sup> 雙點突變，希望藉由這些雙點突變株的產物分析，能進一步證明上述的推論。

利用與先前定點突變相同的方法進行產物分析，從 GC-MS 圖譜的產物分析獲得雙點突變的結果。發現 OSC<sup>Trp232Ala/His234Ala</sup>、OSC<sup>Trp232Ala/Tyr510Ala</sup>、OSC<sup>Trp232Ala/Tyr510Lys</sup> 的 GC-MS 圖譜與原本不含任何 OSC 質體的酵母菌(控制組)的 GC-MS 圖譜相同(圖 3-21 3-22 3-23)，此代表沒有產物生成。而在 OSC<sup>His234Ala/Tyr510Ala</sup> 的 GC-MS 圖譜有新產物的發現(圖 3-24)，此結果符合前述的所提的三者環化機制上有協同催化的相互關係。未來會進一步對 OSC<sup>His234Ala/Tyr510Ala</sup> 有更詳細的產物分析。

Oxidosqualene  
24.36 min

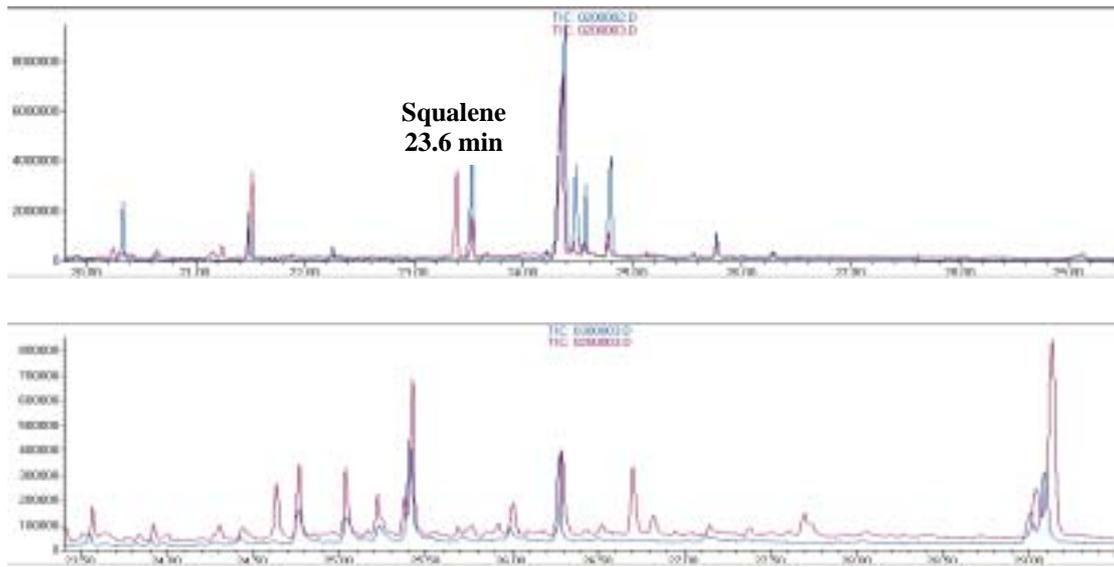


圖 3-21 : 上圖為 OSC $\text{Trp232Ala/Tyr510Ala}$ —AA Fraction(藍色)與控制組(紅色)的 GC-MS 比對,下圖為 OSC $\text{Trp232Ala/Tyr510Ala}$ —Mid Fraction(藍色)與控制組(紅色)的 GC-MS 比對,兩者 GC-MS 圖譜圖形(pattern)相似,說明無新產物的生成

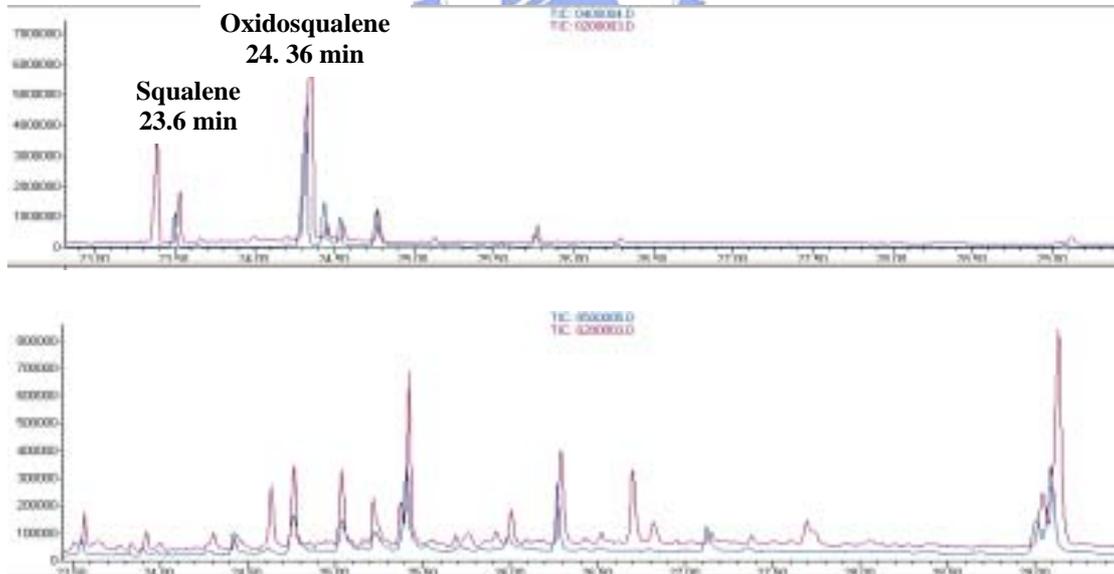


圖 3-22 : 上圖為 OSC $\text{Trp232Ala/Tyr510Lys}$ —AA Fraction(藍色)與控制組(紅色)的 GC-MS 比對,下圖為 OSC $\text{Trp232Ala/Tyr510Lys}$ —Mid Fraction(藍色)與控制組(紅色)的 GC-MS 比對,兩者 GC-MS 圖譜圖形(pattern)相似,說明無新產物的生成

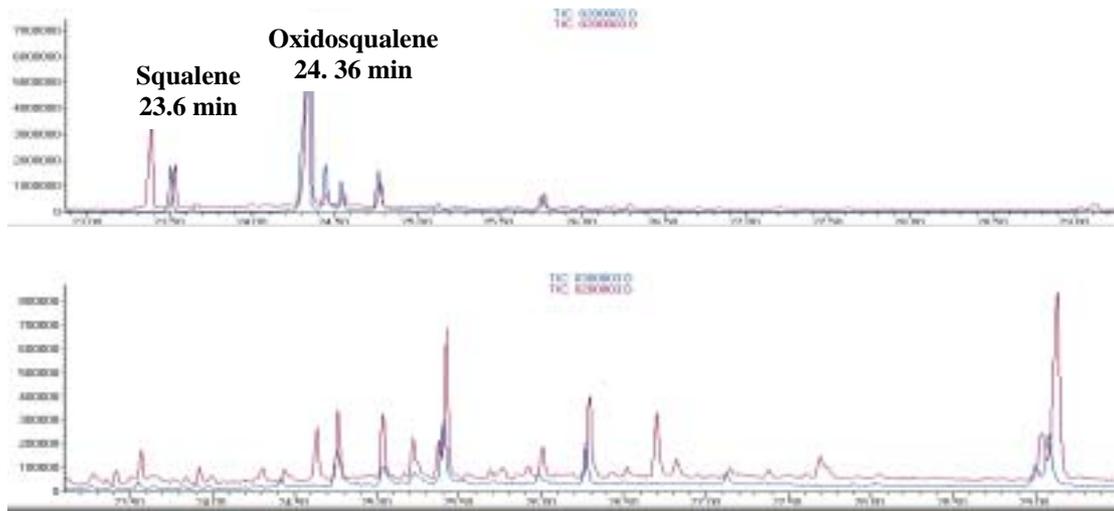


圖 3-23 : 上圖為 OSC<sup>Trp232Ala/His234Ala</sup>—AA Fraction(藍色)與控制組(紅色)的 GC-MS 比對,下圖為 OSC<sup>Trp232Ala/His234Ala</sup>—Mid Fraction(藍色)與控制組(紅色)的 GC-MS 比對,兩者 GC-MS 圖譜圖形(pattern)相似,說明無新產物的生成

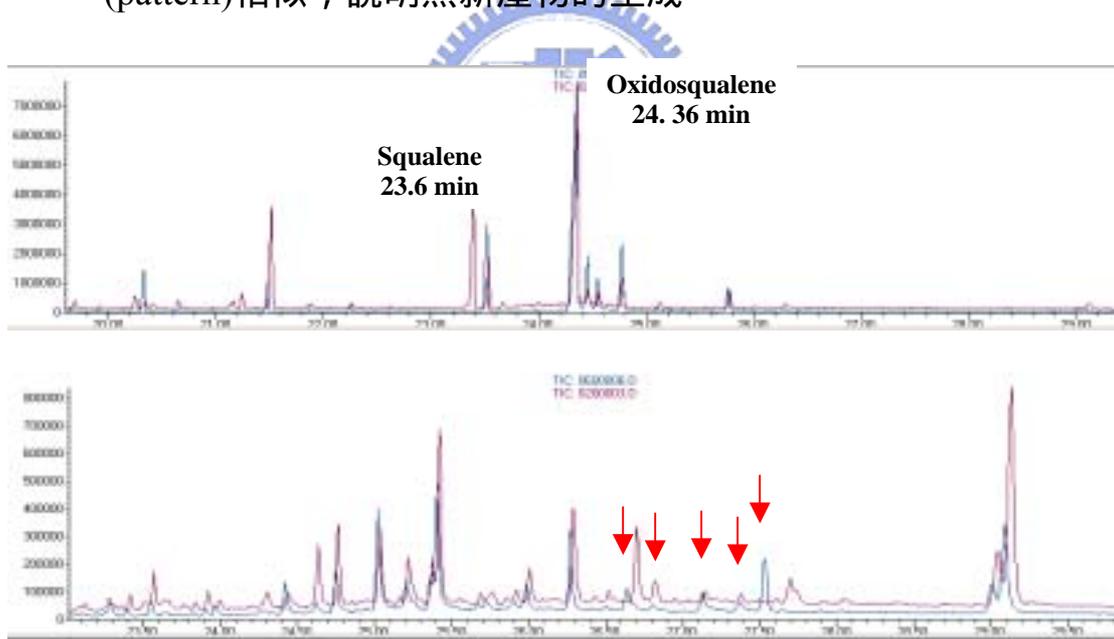


圖 3-24 : 上圖為 OSC<sup>His234Ala/Tyr510Ala</sup>—AA Fraction(藍色)與控制組(紅色)的 GC-MS 比對,下圖為 OSC<sup>His234Ala/Tyr510Ala</sup>—Mid Fraction(藍色)與控制組(紅色)的 GC-MS 比對,上圖兩者 GC-MS 圖譜圖形(pattern)相似,說明無新產物的生成。下圖紅色箭頭處為新產物的滯留時間

## 第四章 結論與未來展望

1. 以 OSC 模擬結構推測的 29 個活性區域胺基酸，利用質體交換/反向篩選的方式進行篩選，篩選在催化過程中，可能擔任協助受質環化與重組，決定酵素活性有無的關鍵區域。篩選出 9 個活性區位置突變可能對環化機制有關鍵影響，為 OSC<sup>F104A</sup>、OSC<sup>H146A</sup>、OSC<sup>W232A</sup>、OSC<sup>W232R</sup>、OSC<sup>H234A</sup>、OSC<sup>M532A</sup>、OSC<sup>W587A</sup>、OSC<sup>F699A</sup> 與 OSC<sup>Y707A</sup>。
2. 對這些突變株進行產物分析，在 GC-MS 發現 OSC<sup>F104A</sup>、OSC<sup>H146A</sup>、OSC<sup>W232R</sup>、OSC<sup>M532A</sup>、OSC<sup>W587A</sup>、OSC<sup>F699A</sup> 與 OSC<sup>Y707A</sup>，GC-MS 圖譜與控制組的圖譜相似，推論:(1)可能這些位置被改變，會使環化重組機制完全瓦解，反應受質在突變酵素中不能摺疊成最適的構形以形成碳陽離子中間物;(2)可能因這些胺基酸的特性因突變而被改變，喪失了原本  $\pi$ -電子穩定高能量中間物，或者影響了開環的起始作用，所以即使反應受質有正確的折疊，也無法使環化反應開始。(3)這些位置的突變可能影響蛋白質的構形，使其失去 OSC 活性而無產物生成。
3. OSC<sup>W232A</sup>、OSC<sup>H234A</sup> 這二個突變株有新產物的出現。比對標準品的 GC 滯留時間(Retention time)及 MS 的質荷比圖譜，發現 OSC<sup>W232A</sup> 的產物為 Protosta-12,24-dien-3 $\beta$ -ol、Lanosterol、Parkeol，而 OSC<sup>H234A</sup> 的產物除了前三者之外，又多了一個新產物。根據 GC-MS、<sup>1</sup>H-NMR 以及 <sup>13</sup>C-NMR 的比對，此新產物為 Protosta-20,24-dien-3 $\beta$ -ol，推論 H234 在環化重排機制上，是利用側鏈含芳香性的  $\pi$  電子共振穩定碳陽離子，幫助環化重組機制。

4. 發現 OSC<sup>W232A</sup> 與 OSC<sup>H234Y</sup> 生成的產物相同，均會生成 Protosta-12,24-dien-3 $\beta$ -ol、Lanosterol 及 Parkeol 四環產物，可能說明 W232 也是藉著陽離子- $\pi$  電子作用去影響催化的機制。
5. OSC<sup>W232A</sup> 與 OSC<sup>H234Y</sup> 有相同的產物圖譜，且在電腦模擬的空間位置上相當靠近，故此對 W232 進行飽和突變(saturated mutagenesis) 實驗，將此位置突變成其他 19 種胺基酸，進行產物分析。一方面探究 W232 與 H234 是否有交互作用影響重排重組的機制，另一方面針對 W232，做更詳細的實驗探討，建構此位置進一步的資訊。
6. 目前 W232 飽和突變實驗的產物圖譜還未完全建構好，rt.26min 及 rt.26.5 min 未知物還未解出，利用 MS 圖譜及銀染 TLC 片獲得一些結構的初步資訊，而有下述推論
  - (1)W232 主要的作用不是影響 A 環、B 環的形成，其對 Asp456 誘導 2,3-oxidosqualene 開環作用較無影響。
  - (2)W232 較不干擾反應受質摺疊的環化過程，也許 W232 與 H234 在環化上有協同作用，同會利用其側鏈上富含電子雲的基團，藉由碳陽離子- $\pi$  電子共振作用穩定反應受質摺疊環化的高能碳陽離子。
  - (3)W232 主要影響環化後的重組機制，W232 的突變效應會使氫化基、甲基轉移停在不同位置的碳陽離子，繼而脫氫中止反應而有產物多樣性。
7. 對 W232 飽和突變的突變株建構 20 個電腦模擬圖，以電腦模擬圖推論出 OSC Trp232 可能是利用其富含電子的側鏈，與其鄰近的

His234 協同穩定環化反應過程中產生的高能碳陽離子中間物。並且因 Trp 側鏈較大的立體空間特性，協助 His234 正確定位，對環化反應終止的脫氫步驟有輔助的功能。以及與酵素上鄰近基團 His234、Tyr510 有氫鍵拉扯的交互作用。

8. 未來要將 rt.26min 及 rt.26.5 min 未知物解出結構，建構好 W232 飽和突變實驗的產物圖譜，並進一步分析雙點突變的產物，建構雙點突變電腦模擬圖，期待對於 OSC 活性區域的推測與環化與重組機制有更深一層的認識。



## 第五章 參考文獻

- [1] P. C. C. a. R. A. Harvey, *Lippincotts Illustrated Review Biochemistry*, 2/e ed., Lippincott Williams & Wilkins, **2001**.
- [2] T. Martin, S. E. Parker, R. Hedstrom, T. Le, S. L. Hoffman, J. Norman, P. Hobart, D. Lew, *Hum. Gene Ther.* **1999**, *10*, 759.
- [3] T. Schulz-Gasch, M. Stahl, *J. Comput. Chem.* **2003**, *24*, 741.
- [4] K. Simons, D. Toomre, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2000**, *1*, 31.
- [5] K. Simons, R. Eehalt, *J. Clin. Invest* **2002**, *110*, 597.
- [6] L. J. Foster, C. L. De Hoog, M. Mann, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2003**, *100*, 5813.
- [7] V. Quesney-Huneus, H. A. Galick, M. D. Siperstein, S. K. Erickson, T. A. Spencer, J. A. Nelson, *J. Biol. Chem.* **1983**, *258*, 378.
- [8] V. Quesney-Huneus, M. H. Wiley, M. D. Siperstein, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **1979**, *76*, 5056.
- [9] T. Dang, I. Abe, Y. F. Zheng, G. D. Prestwich, *Chem. Biol.* **1999**, *6*, 333.
- [10] B. DiDomenico, *Curr. Opin. Microbiol.* **1999**, *2*, 509.
- [11] I. Abe, Y. F. Zheng, G. D. Prestwich, *Biochemistry* **1998**, *37*, 5779.
- [12] R. Xu, G. C. Fazio, S. P. Matsuda, *Phytochemistry* **2004**, *65*, 261.
- [13] I. Abe, M. Rohmer, G. D. Prestwich, *Chem. Rev.* **1993**, *93*, 2189.
- [14] K. U. Wendt, G. E. Schulz, E. J. Corey, D. R. Liu, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2000**, *39*, 2812.
- [15] T. Schulz-Gasch, M. Stahl, *J. Comput. Chem.* **2003**, *24*, 741.
- [16] J. A. Zoltewicz, N. M. Maier, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 4985.
- [17] P. C. Miklis, R. Ditchfield, T. A. Spencer, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 10482.
- [18] J. P. Gallivan, D. A. Dougherty, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **1999**, *96*, 9459.
- [19] M. A. Lovato, E. A. Hart, M. J. Segura, J. L. Giner, S. P. Matsuda, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 13394.
- [20] D.O. Chemistry, B. University, Providence, R. Island, *Acc. Chem. Res.* **1985**, *18*, 220.
- [21] M. J. Segura, B. E. Jackson, S. P. Matsuda, *Nat. Prod. Rep.* **2003**, *20*, 304.

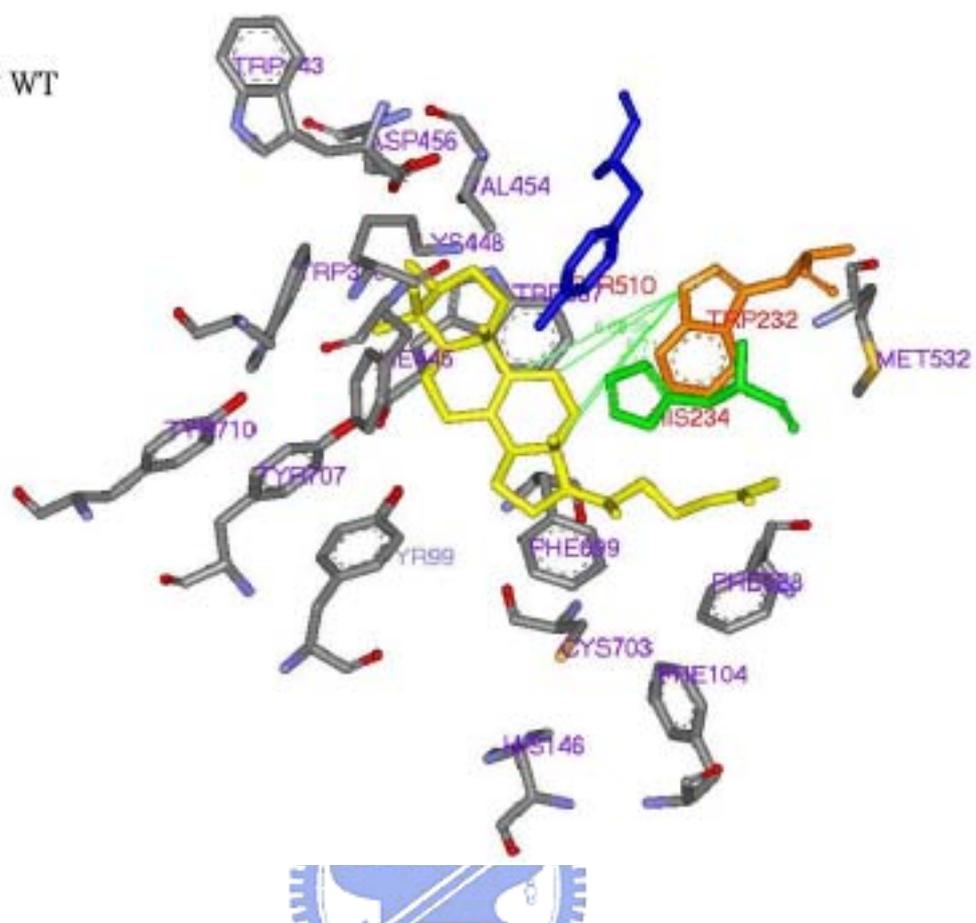
- [22] H. S. Robinson, *J. Natl. Med. Assoc.* **1970**, *62*, 474.
- [23] D. H. Barton, M. J. Day, R. H. Hesse, M. M. Pechet, *J. Chem. Soc. [Perkin 1]* **1975**, 2252.
- [24] E. J. Corey, S. C. Virgil, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 4025.
- [25] P. G. Barton, F. D. Gunstone, *J. Biol. Chem.* **1975**, *250*, 4470.
- [26] B. robustell, I. Abe, G. D. prestwich, *tetrahedron letters* **1998**, *39*, 957.
- [27] B. J.robustell, I. Abe, G. D. prestwich, *tetrahedron letters* **1998**, *39*, 9385.
- [28] I. Abe, M. Rohmer, G. D. Prestwich, *Chem. Rev.* **1993**, *93*, 2189.
- [29] E. J. Corey, D. D. Staas, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 3526.
- [30] E. J. Corey, H. Cheng, C. H. Baker, S. P. T. Matsuda, D. Li, X. Song, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 1277.
- [31] E. J. Corey, C. H. B. Hengmiao Cheng, S. P. T. Matsuda, D. Li, X. Song, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 1289.
- [32] T. Schulz-Gasch, M. Stahl, *J. Comput. Chem.* **2003**, *24*, 741.
- [33] J. Corsino, P. R. de Carvalho, M. J. Kato, L. R. Latorre, O. M. Oliveira, A. R. Araujo, V. D. Bolzani, S. C. Franca, A. M. Pereira, M. Furlan, *Phytochemistry* **2000**, *55*, 741.
- [34] E. J. Corey, S. P. Matsuda, C. H. Baker, A. Y. Ting, H. Cheng, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1996**, *219*, 327.
- [35] W. S. Johnson, S. D. Lindell, J. Steele, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 5852.
- [36] W. S. Johnson, S. J. Telfer, S. Cheng, U. Schubert, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 2517.
- [37] R. J. Griffin, M. F. Stevens, *Anticancer Drug Des.* **1992**, *7*, 443.
- [38] E. J. Corey, S. C. Virgil, S. Sarshar, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 8171.
- [39] I. Abe, G. D. Prestwich, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 802.
- [40] I. Abe, M. Bai, X. Y. Xiao, G. D. Prestwich, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1992**, *187*, 32.
- [41] M. J. Segura, B. E. Jackson, S. P. Matsuda, *Nat. Prod. Rep.* **2003**, *20*, 304.
- [42] S. P. Matsuda, L. B. Darr, E. A. Hart, J. B. Herrera, K. E. McCann, M. M. Meyer, J. Pang, H. G. Schepmann, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 2261.
- [43] T. Kushiro, M. Shibuya, K. Masuda, Y. Ebizuka, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 6816.

- [44] T. Kushiro, M. Shibuya, K. Masuda, Y. Ebizuka, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 6816.
- [45] R. Thoma, T. Schulz-Gasch, B. D'Arcy, J. Benz, J. Aebi, H. Dehmlow, M. Hennig, M. Stihle, A. Ruf, *Nature* **2004**, *432*, 118.
- [46] K. U. Wendt, K. Poralla, G. E. Schulz, *Science* **1997**, *277*, 1811.
- [47] P. Milla, A. Lenhart, G. Grosa, F. Viola, W. A. Weihofen, G. E. Schulz, G. Balliano, *Eur. J. Biochem.* **2002**, *269*, 2108.
- [48] T. Hoshino, K. Shimizu, T. Sato, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2004**, *43*, 6700.
- [49] K. U. Wendt, G. E. Schulz, E. J. Corey, D. R. Liu, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2000**, *39*, 2812.
- [50] W. K. W. Jennifer B. R. Herrera, and Seiichi P. T. Matsuda, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 6765.
- [51] S. Lodeiro, M. J. Segura, M. Stahl, T. Schulz-Gasch, S. P. Matsuda, *Chembiochem* **2004**, *5*, 1581.
- [52] M. J. Segura, B. E. Jackson, S. P. Matsuda, *Nat. Prod. Rep.* **2003**, *20*, 304.
- [53] M. M. Meyer, R. Xu, S. P. Matsuda, *Org. Lett.* **2002**, *4*, 1395.
- [54] T. Kushiro, M. Shibuya, K. Masuda, Y. Ebizuka, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 6816.
- [55] T. Hoshino, K. Shimizu, T. Sato, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2004**, *43*, 6700.
- [56] K. U. Wendt, K. Poralla, G. E. Schulz, *Science* **1997**, *277*, 1811.
- [57] I. Abe, Y. F. Zheng, G. D. Prestwich, *Biochemistry* **1998**, *37*, 5779.
- [58] K. U. Wendt, A. Lenhart, G. E. Schulz, *J. Mol. Biol.* **1999**, *286*, 175.
- [59] T. Dang, I. Abe, Y. F. Zheng, G. D. Prestwich, *Chem. Biol.* **1999**, *6*, 333.
- [60] T. Hoshino, K. Shimizu, T. Sato, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2004**, *43*, 6700.
- [61] E. E. Van Tamelen, J. Willet, M. Schwartz, R. Nadeau, *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, *88*, 5937.
- [62] E. L. Rosey, G. C. Stewart, *J. Bacteriol.* **1992**, *174*, 6159.
- [63] R. J. Griffin, M. F. Stevens, *Anticancer Drug Des.* **1992**, *7*, 443.
- [64] G. S. Chen, C. S. Chang, W. M. Kan, C. L. Chang, K. C. Wang, J. W. Chern, *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 3759.
- [65] K. U. Wendt, G. E. Schulz, E. J. Corey, D. R. Liu, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2000**, *39*, 2812.

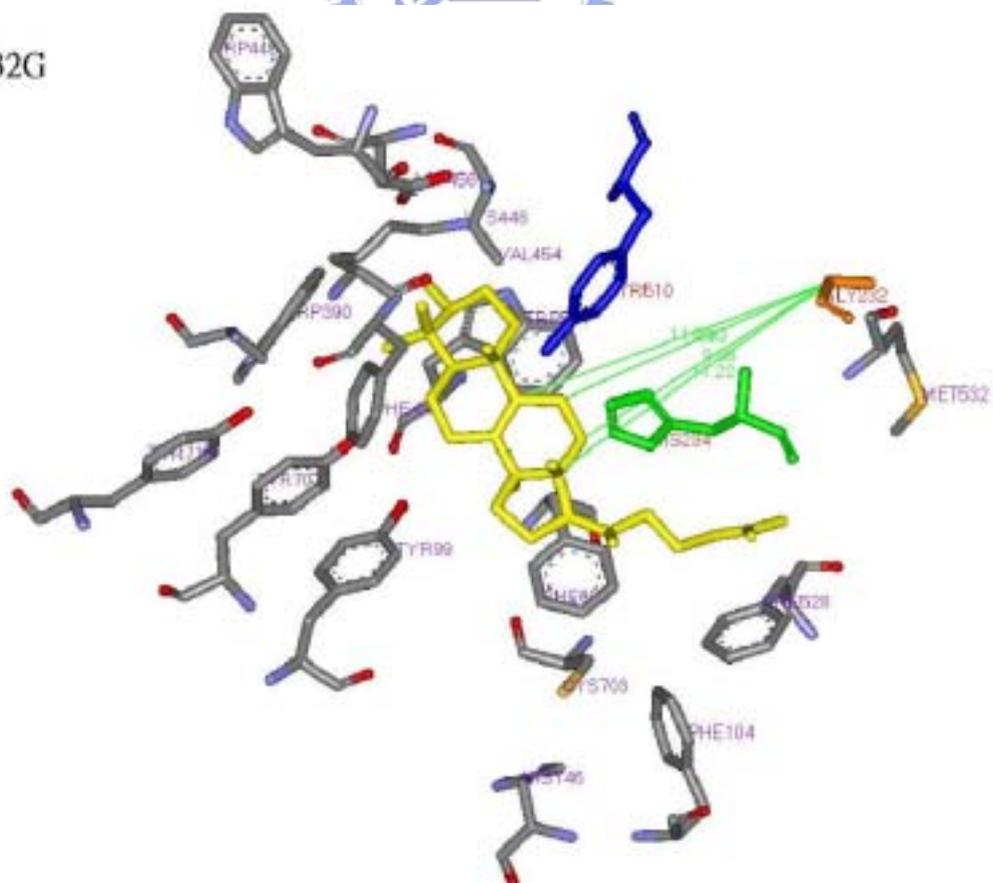
- [66] R. Xu, G. C. Fazio, S. P. Matsuda, *Phytochemistry* **2004**, 65, 261.
- [67] T. K. Wu, C. H. Chang, *Chembiochem* **2004**, 5, 1712.
- [68] K. U. Wendt, K. Poralla, G. E. Schulz, *Science* **1997**, 277, 1811.
- [69] T. Dang, I. Abe, Y. F. Zheng, G. D. Prestwich, *Chem. Biol.* **1999**, 6, 333.
- [70] J. P. Gallivan, D. A. Dougherty, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **1999**, 96, 9459.
- [71] K. U. Wendt, A. Lenhart, G. E. Schulz, *J. Mol. Biol.* **1999**, 286, 175.
- [72] E. J. Corey, C. H. B. Hengmiao Cheng, S. P. T. Matsuda, D. Li, X. Song, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 1289.
- [73] P. C. C. a. R. A. Harvey, *Lippincotts Illustrated Review Biochemistry*, 2/e ed., Lippincott Williams & Wilkins, **2001**.
- [74] S. Lodeiro, M. J. Segura, M. Stahl, T. Schulz-Gasch, S. P. Matsuda, *Chembiochem* **2004**, 5, 1581.
- [76] R. Thoma, T. Schulz-Gasch, B. D'Arcy, J. Benz, J. Aebi, H. Dehmlow, M. Hennig, M. Stihle, A. Ruf, *Nature* **2004**, 432, 118.



OSC WT

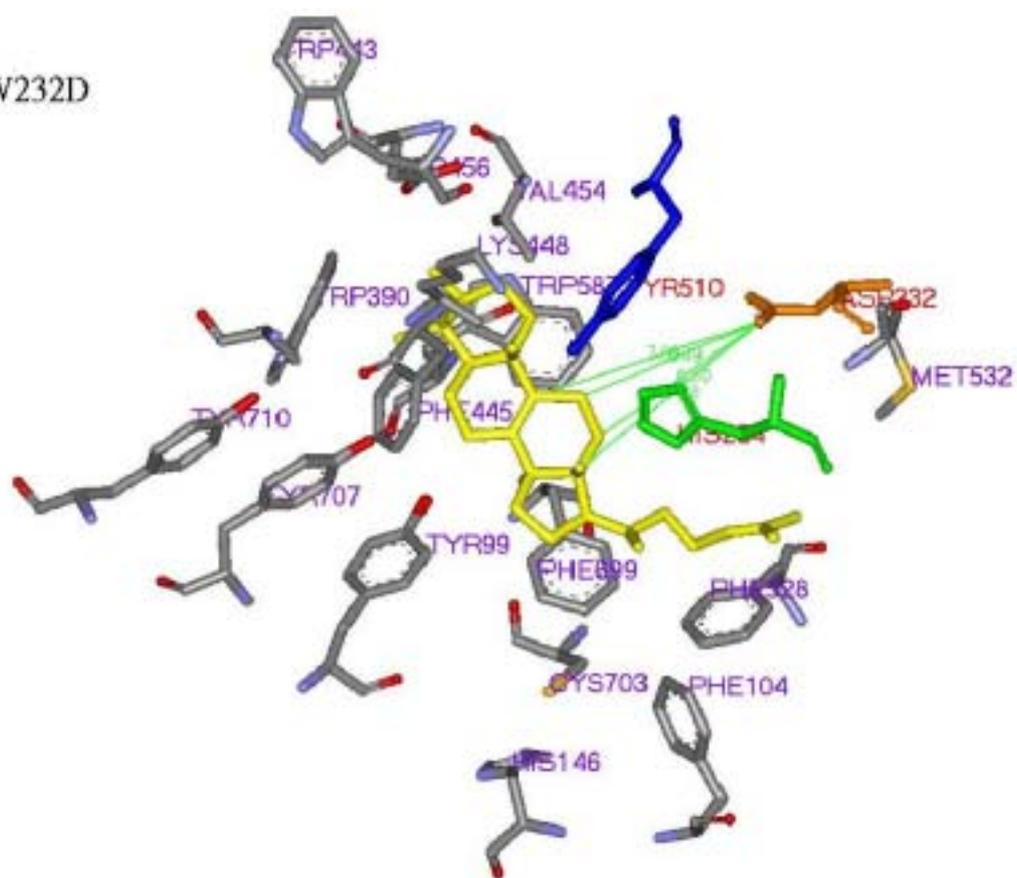


W232G

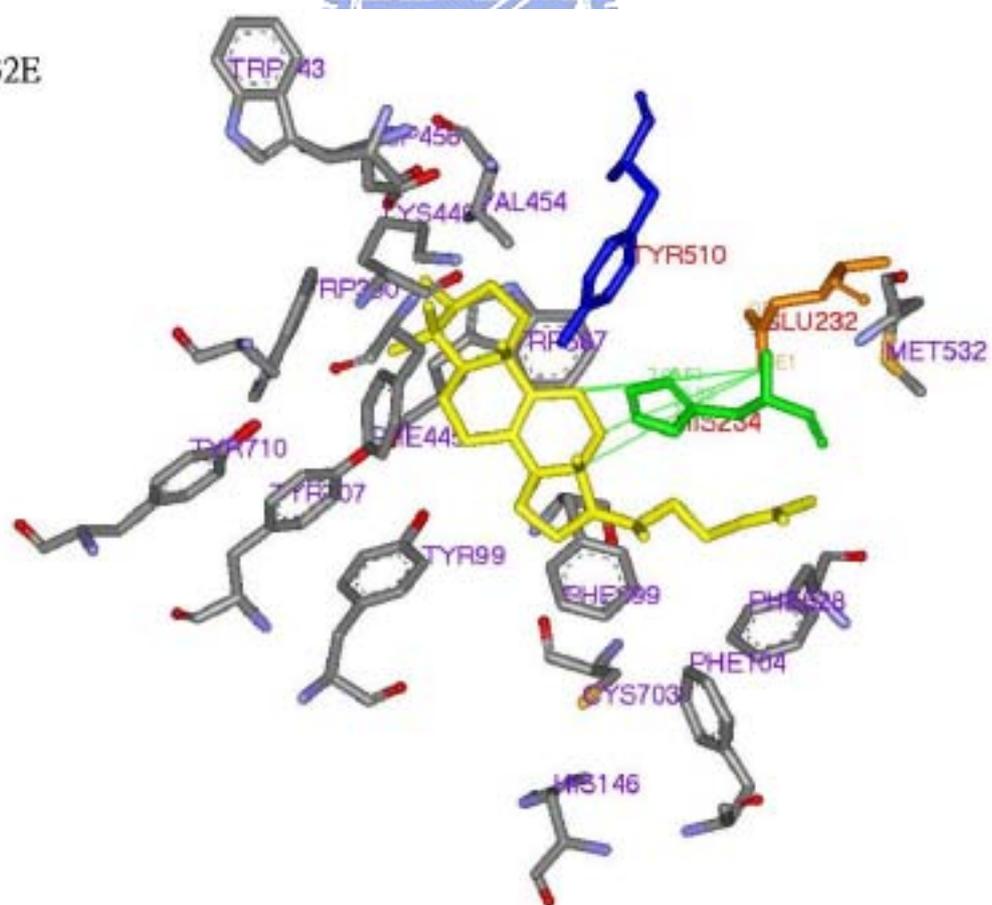




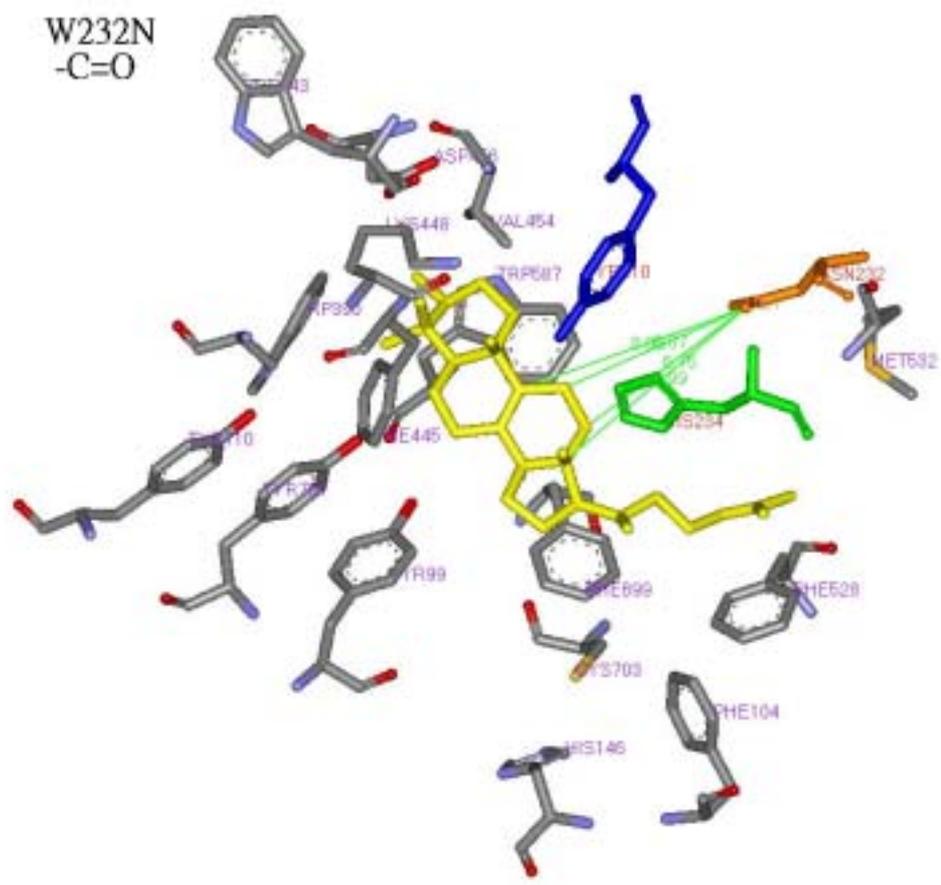
W232D



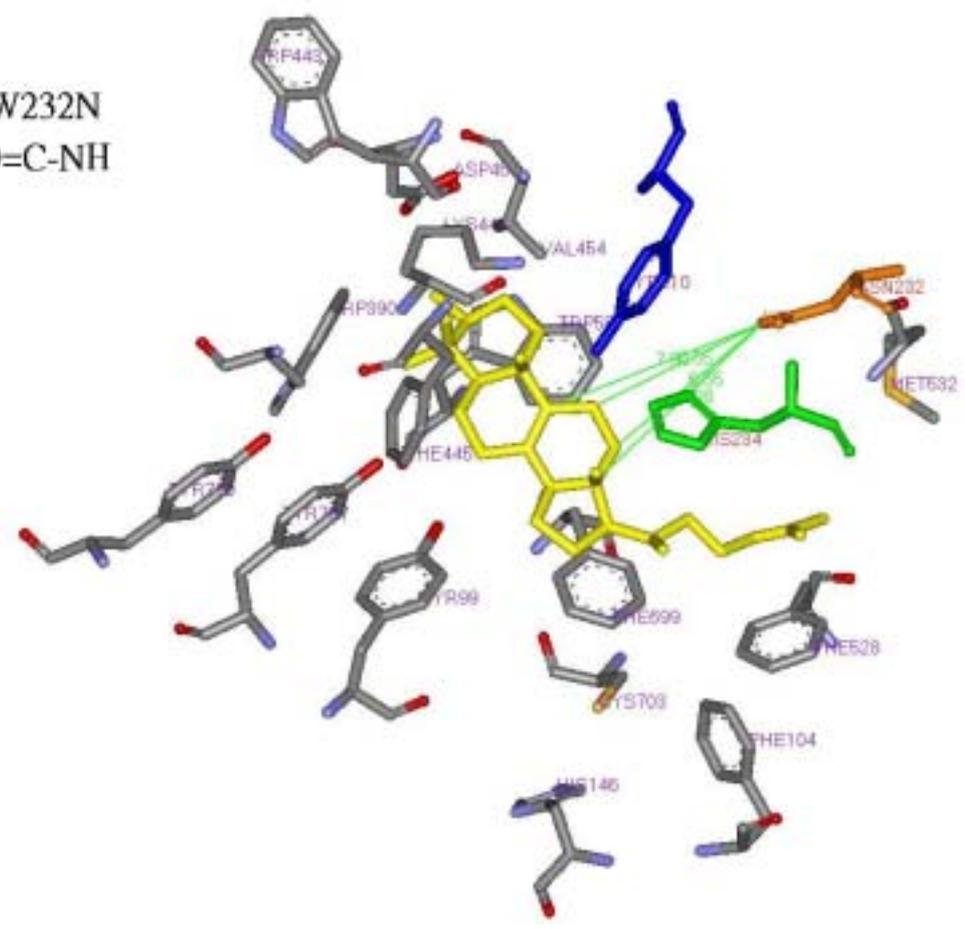
W232E



W232N  
-C=O

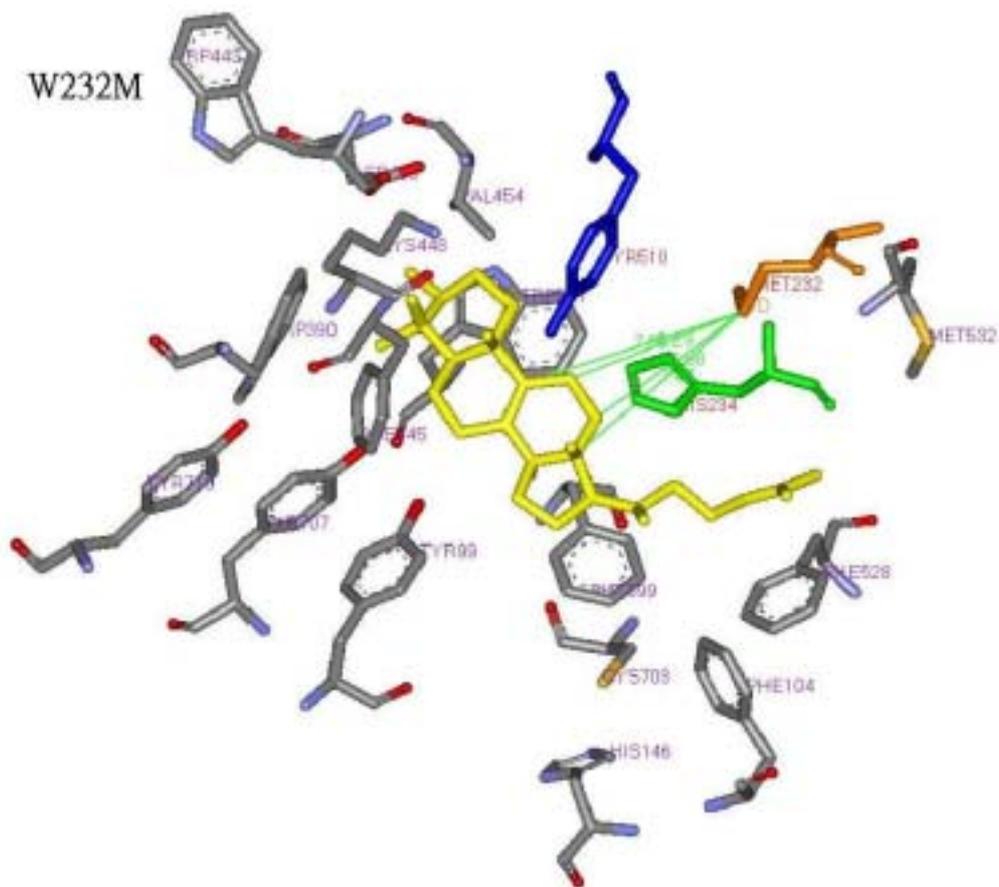


W232N  
O=C-NH

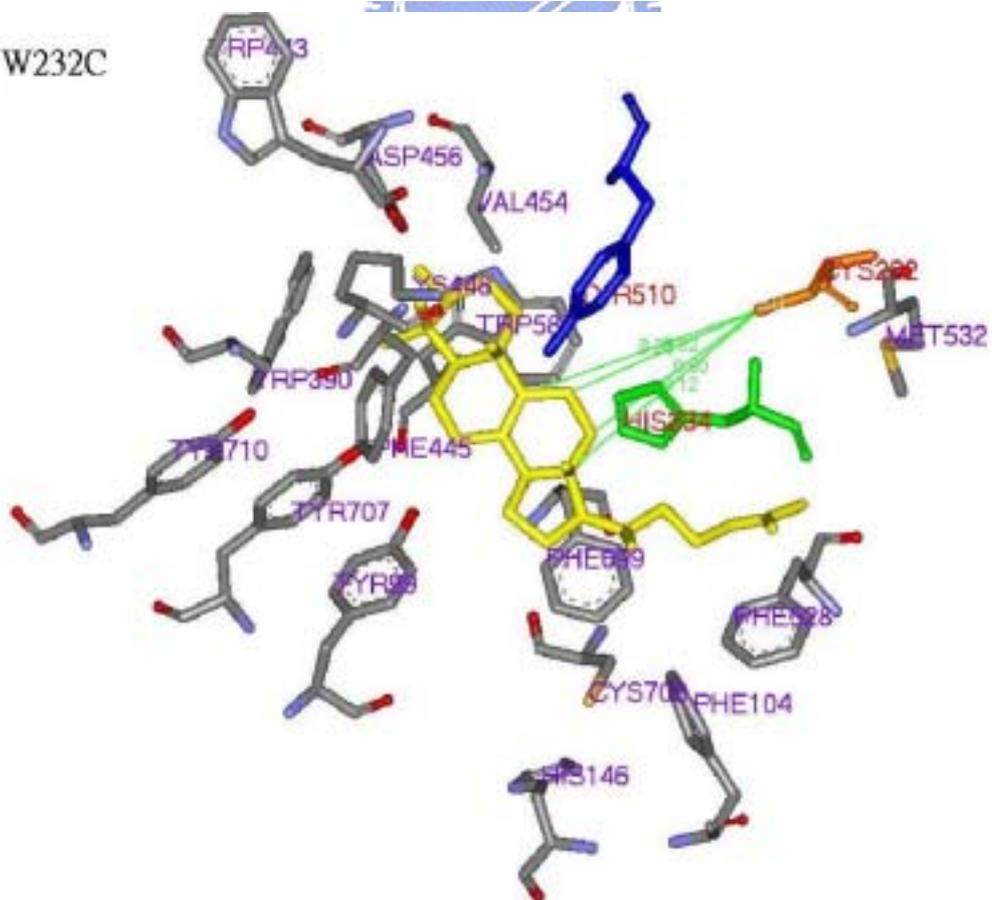


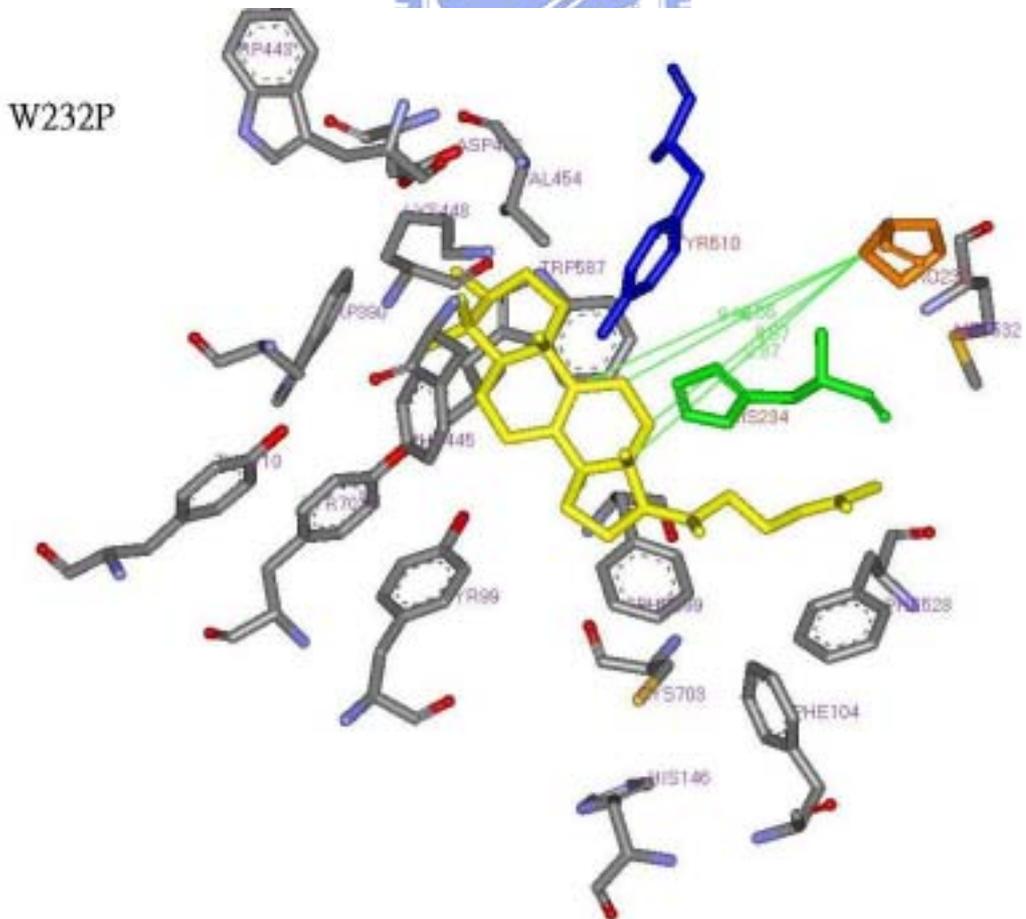
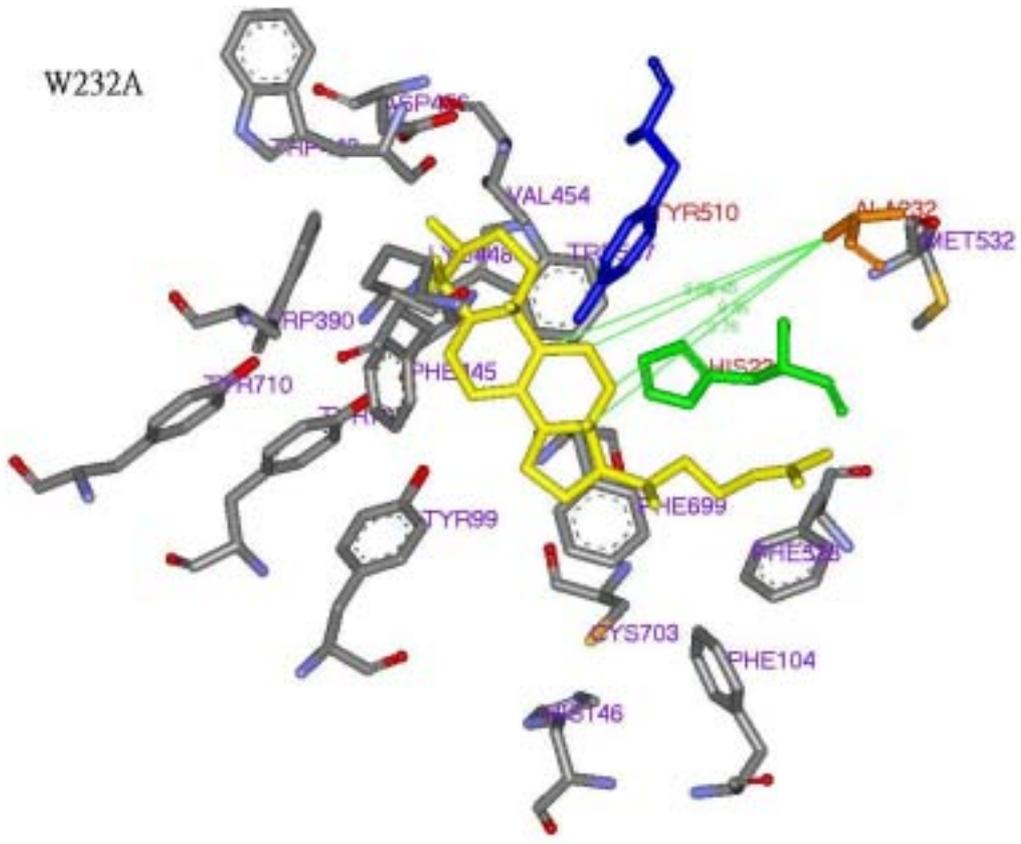


W232M



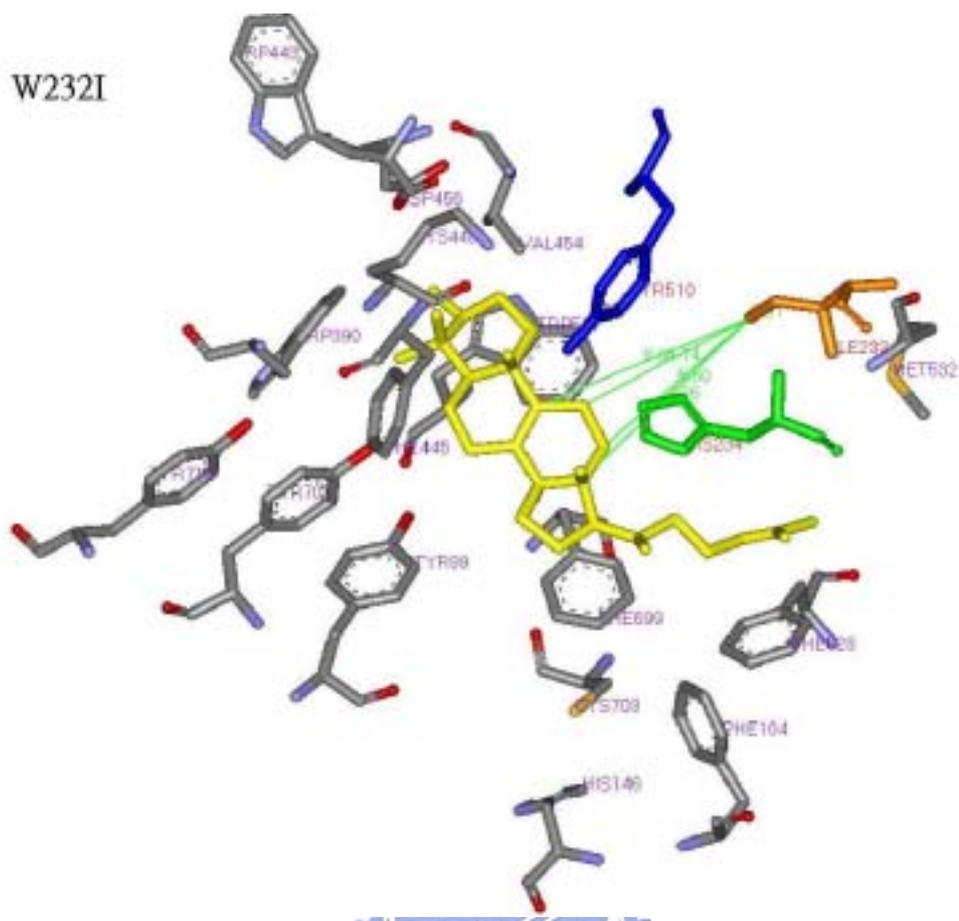
W232C



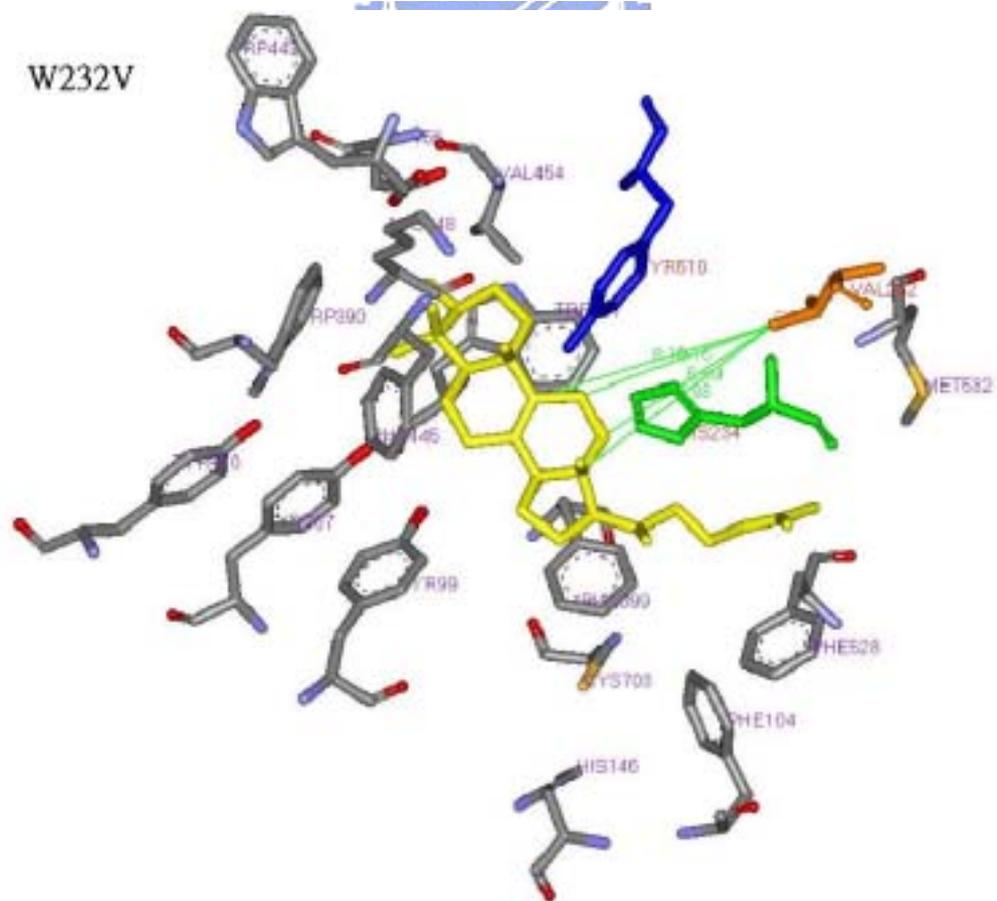




W232I

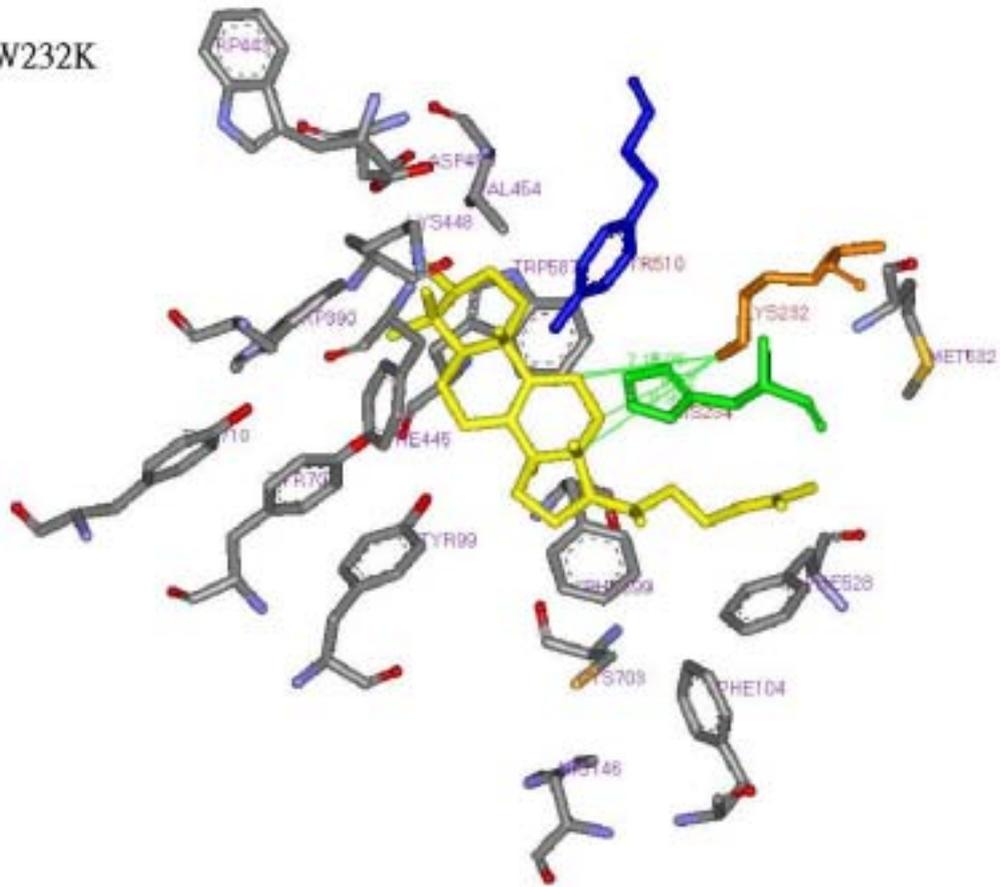


W232V





W232K



W232R

