

國立交通大學

生物科技學系

碩士論文

發展及應用以 Ro48-8071 為基礎的新  
型式螢光性探針並針對氧化鯊烯環化  
酵素進行抑制作用的研究

**Development and Application of Newly  
Fluorescent Ro48-8071-Derived Probes  
to Study Oxidosqualene Cyclase**

研究生：魏大景

指導教授：吳東昆 博士

中華民國九十六年七月

發展及應用以 Ro48-8071 為基礎的新型式螢光性探針並針對氧化鯊  
烯環化酵素進行抑制作用的研究

**Development and Application of Newly Fluorescent  
Ro48-8071-Derived Probes to Study Oxidosqualene Cyclase**

研究生：魏大景

Student : Ta-Ching Wei

指導教授：吳東昆 教授

Advisor : Dr. Tung-Kung Wu

國立交通大學  
生物科技學系  
碩士論文



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, 2007

Hsinchu, Taiwan, Republic of China

中華民國九十六年七月

# 發展及應用以 Ro48-8071 為基礎的新型式螢光性探針並針對氧化鯊

## 烯環化酵素進行抑制作用的研究

研究生：魏大景

指導教授：吳東昆 教授

國立交通大學 生物科技學系

### 摘要

氧化鯊烯環化酵素(OSC, E.C.5.4.99.-)將受質氧化鯊烯經由一連串環化/重組的反應催化形成膽固醇的前驅物-羊毛硬脂醇。此家族的酵素在固醇類和三萜類產物的生合成途徑中扮演著特別的角色，並且對於降膽固醇藥物以及抗真菌劑的研發都很有幫助。本論文已成功的從牛肝中，經由一連串的純化步驟，並利用SDS-PAGE電泳分析，得到分子量約為80 kDa純的氧化鯊烯環化酵素。並且利用Ro48-8071這一個很有效的氧化鯊烯環化酵素抑制劑，將其與實驗中所選的五個具螢光性質的化合物：4-(4,5-diphenyl-1H-imidazol-2-yl)-phenylboronic acid(DPA)、naphthalene-1-boronic acid(NA-1)、naphthalene-2-boronic acid(NA-2)、biphenyl-3-boronic acid(BP-3) 和 biphenyl-4-boronic acid(BP-4)，利用Suzuki偶合的方法進行結合，期望發展成具有抑制效果的螢光探針，經由質譜儀與核磁共振儀的分析後，確定已成功的合成出目標物。另外，由抑制酵素活性的實驗中發現，Ro4-NA1、Ro4-NA2和Ro4-BP4約在100 $\mu$ M的濃度時有明顯的抑制活性，而Ro4-BP3約在100 $\mu$ M的濃度時有相較於Ro4-NA1、Ro4-NA2和Ro4-BP4具有稍差的抑制活性。而Ro4-DPA抑制活性最差，在濃度100 $\mu$ M時尚無明顯的抑制，由此結果推測，可能為經修飾的螢光化合物對於酵素有較大的立體障礙，所以抑制的效果沒有未經過修飾的Ro48-8071來的有效；因此並利用入塢作用(Docking)的實驗方式加以探討經螢光探針修飾的Ro48-8071在牛肝中的氧化鯊烯環化酵素活性區中的立體空間關係以及此修飾對於抑制能力的影響。另外，在螢光光譜的測量實驗發現，氧化鯊烯環化酵素與Ro4-DPA做混合與沒有做

混合的對照組在螢光放射光譜上沒有改變，但是在經過去鹽管柱（desalting column）層析法將蛋白質與沒有作用的螢光探針做分離，發現在有蛋白質出現的部分有螢光的現象，初步推測有可能是因為DPA的結構沒有進入酵素的活性區中，使得螢光的強度沒有被削弱，之後還要再做進一步的確認。

本論文希望最後能利用這些帶有螢光特性的Ro48-8071衍生抑制劑能提供氧化鯊烯環化酵素在結構與功能性上的探討，或能更進一步提供在蛋白質體學上的應用，以及對於降膽固醇藥物篩選上有所幫助。



# Development and Application of Newly Fluorescent Ro48-8071-Derived Probes to Study Oxidosqualene Cyclase

Student : Ta-Ching Wei

Advisor : Dr. Tung-Kung Wu

Department of Biological Science and Technology  
National Chiao Tung University

## Abstract

Oxidosqualene cyclases (OSC, E.C.5.4.99.-) catalyze the conversion of the linear 2,3-oxidosqualene into the fused ring compounds such as lanosterol, the precursor of cholesterol, via a series of cyclization and rearrangement. Due to its intrinsic important role in the biosynthetic pathway of steroids and triterpenoids, OSC has been an attractive target for the development of antifungal and hypocholesterolemic drugs. Accordingly, bovine liver OSC had been successfully purified via three chromatographic columns in our laboratory and exhibited a clear single band with molecular weight about 80 kDa from the analysis of SDS-PAGE. Moreover, OSC in different mammalian sources has been effectively inhibited by a potent inhibitor, Ro48-8071. But the different orientation of this inhibitor was examined from either crystal structure or photoaffinity labeling experiments. In order to better understand the inhibiting mechanism as well as to solve the exact inhibitor binding site, several Ro48-8071-based fluorescent probes were developed. Those fluorescence derivatives including 4-(4,5-diphenyl-1H-imidazol-2-yl)-phenylboronic acid (DPA), biphenyl-3-boronic acid (BP-3), biphenyl-4-boronic acid (BP-4), naphthalene-1-boronic acid (NA-1) and naphthalene-2-boronic acid (NA-2) were synthesized successfully from Ro48-8071 using the palladium-catalyzed Suzuki coupling reactions and confirmed by GC/MS and nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy analysis.

According to the inhibition experiment of all newly synthesized fluorescence probes, it was found that Ro4-NA1, Ro4-NA2 and Ro4-BP4 showed apparent inhibition activity at the concentration of 100 $\mu$ M. Ro4-BP3 had also obvious

inhibition activity at the concentration up to 100 $\mu$ M but less than Ro4-NA1, Ro4-NA2 and Ro4-BP4. Among those fluorescent probes, Ro4-DPA showed the worst inhibition even though at the concentration of 100 $\mu$ M. The results of inhibition experiment indicated that the fluorescent modification of Ro48-8071 dramatically reduces the inhibition activity. The steric effect or orientation changes may occur among these modified inhibitors within the enzymatic active site. In terms of the molecular docking experiment, the interactions between the fluorescent modification of Ro48-8071 probes and the active site of bovine liver OSC as well as the orientation of probes have dramatically changed. Hence, the lower-inhibition activity via fluorescent modification could be reasonably explained via the three-dimensional protein-ligand docked complex models.

On the other hand, from the fluorescent spectra examination, there is no obvious difference between the bovine liver OSC-Ro4-DPA complex and the native Ro4-DPA molecule. However, after Hi-Trap desalting column purification, the fraction with OSC also exhibited slight fluorescent intensity, the result showed that the DPA group might interact but not integrate within the protein active site. In the future, further improved newly site-specific fluorescent probes will be developed and applied to the field of proteomics for effectively screening of OSC drugs.

## 謝誌

回首這七百多天的研究生涯，充滿了各式各樣的挑戰，以及許許多多的寶貴回憶。研究是一條不歸的路，必需經歷各種的挑戰以及許多的失敗在加上些許的運氣才能獲得豐碩的成果，即使沒有好的成果，但過程中所學習到的各種經驗以及實驗技巧，都將成為我在研究這條路上珍貴的寶藏。然而這篇論文的結束，並不代表研究的路就此結束，而是代表著新的開始、新的挑戰，以及許多方面還需要再努力充實自己。在這段過程中所經歷的悲喜，以及感動過的所有人事物，和支持我幫忙我的所有的人，不論深淺輕重，都將在心底永存。而這篇論文的完成，首先最為感謝的是我的指導教授吳東昆博士，給我進入實驗室學習的機會，在實驗上指導實驗設計的觀念，以及面對事情應有的積極態度，和最後論文的修改及建議。此外，也非常感謝口試委員袁俊傑老師、林敬堯老師及刁維光老師在事務繁忙之餘抽空審閱修改我的論文初稿，並對於本論文的實驗設計以及實驗結果與討論方面給予許多寶貴的意見，讓我能將此論文撰寫得更加完備。

另外，最想要感謝的是實驗室的大學長程翔學長，他亦師亦友的教導我，以及對於這個題目的設計和遇到實驗瓶頸時都給予了非常大的幫助，可以說是孕育這個題目的母親；感謝媛婷學姊在Pichia表現上的指導及幫助，以及生活上的關心和照顧；感謝裕國學長在實驗上的建議以及實驗技巧上的指導，以及協助抗體的製作及指導；感謝晉豪學長在實驗以及論文寫作上的建議，讓我受益良多；感謝晉源學長在昆蟲病毒表現上的教導以及實驗上的協助，讓我學到了不少東西；感謝文鴻學長在DNA定序上的幫忙以及實驗和日常生活上的照顧；感謝在我剛進入實驗室時教導我做實驗的師傅小芭，讓我也學會了純化以及phage display的技術；也感謝已經畢業的學長宏明跟宗哥在我碩一的時候帶給實驗室歡樂的氣氛和新的博班學姐Nayak讓我有許多練習講英文的機會。再來要感謝的就是和我一同奮戰一同度過無數個打拚夜晚的戰友們：感謝很有自信的皓宇在牛肝純化上的協助以及實驗



上的加油打氣；感謝跟我一同瘋一同呆的好哥們小妹在我實驗不順時的鼓勵和協助；感謝好朋友呆文宣，在我打混的時候會拉我一把，讓我能即時清醒。也感謝學弟妹文祥、小高、采婷以及新進的實驗室的成員聖慈、天昶、禕庭、亦諄在我實驗的期間以及最後寫論文及口試時的幫忙。

此外，也要感謝交通大學應化貴儀中心李蘊明小姐在MASS分析上的協助，以及清大化學貴儀中心彭菊蘭小姐在NMR分析上的幫忙。

最後要感謝養育我的爸爸媽媽和我的弟弟，感謝你們一路的關心和鼓勵，還有女友馨儀在這研究所這兩年一路的陪伴與照顧和適時的鼓勵，讓我在低潮的時候能夠振作，也感謝所以關心過我以及指導過我的人，在此以小小的篇幅以及分享我的研究成果來表達我真誠的謝意，真的謝謝大家！





# 目 錄

	頁次
中文摘要.....	I
英文摘要.....	III
謝誌.....	V
目錄.....	VII
圖目錄.....	X
表目錄.....	XII
附錄.....	XIII

## 第一章 緒論

1-1 膽固醇的重要性.....	1
1-2 氧化鯊烯環化酵素的簡介.....	4
1-3 降低膽固醇藥物的新目標-氧化鯊烯環化酵素.....	7
1-3-1 氧化鯊烯環化酵素為抑制膽固醇生成的目標蛋白.....	8
1-3-2 抑制氧化鯊烯環化酵素造成的雙機制調控作用.....	9
1-4 氧化鯊烯環化酵素的酵素學.....	10
1-5 鯊烯-蛇麻烯環化酵素的晶體結構.....	12
1-6 鯊烯-蛇麻烯環化酵素與抑制物 Ro48-8071 複合物的晶體結構...17	
1-7 利用嗜甲醇酵母菌 <i>Pichia pastoris</i> 表現外來蛋白.....	20
1-7-1 <i>Pichia pastoris</i> 對甲醇的代謝作用.....	21
1-7-2 <i>Pichia pastoris</i> 之表現載體.....	22
1-7-3 表現質體之嵌入(integration)染色體之作用方式.....	23
1-7-4 <i>Pichia pastoris</i> 之蛋白質後修飾作用(post-translational modification).....	23
1-8 研究動機與目的.....	25

## 第二章 實驗材料與方法

### 實驗材料

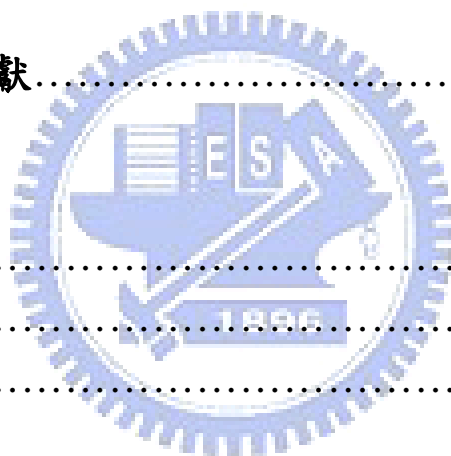
2-1 實驗材料與藥品.....	28
------------------	----

2-2 緩衝溶液與實驗溶液的配置.....	31
2-3 實驗儀器.....	35
<b>實驗方法</b>	
2-4 牛肝中氧化鯊烯環化酵素的純化.....	36
2-4-1 溶解微粒體(Microsome).....	37
2-4-2 粗萃取液(Crude Extract).....	37
2-4-3 Q-Sepharose 陰離子交換管柱層析.....	37
2-4-4 Hydroxyapatite Gel 管柱層析.....	38
2-4-5 HiTrap Heparin 管柱層析.....	38
2-4-6 酵素的分子量及純度分析.....	38
2-4-7 酵素溶液的保存.....	39
2-5 蛋白質濃度與酵素活性的測量.....	40
2-6 利用 <i>Pichia</i> 系統表現牛肝氧化鯊烯環化酵素.....	42
2-6-1 表現載體的構築.....	42
2-6-1 酵母菌之轉化作用.....	44
2-6-1 重組酵母菌之表現.....	46
2-7 受質 2,3-氧化鯊烯的合成.....	47
2-8 氧化鯊烯環化酵素抑制物 Ro48-8071 的合成.....	49
2-9 新型螢光抑制物的合成.....	52
2-9-1 含有硼酸基團螢光探針的硼酸酯化反應.....	52
2-9-2 螢光探針與抑制物 Ro48-8071 的結合.....	54
2-10 新型螢光抑制物對於氧化鯊烯環化酵素的抑制.....	57

### 第三章 結果與討論

3-1 氧化鯊烯環化酵素的純化.....	58
3-1-1 酵素的溶解與粗萃取液.....	58
3-1-2 管柱層析的純化分析.....	58
3-1-3 酵素分子量判定.....	61
3-2 利用 <i>Pichia</i> 表現系統表現牛的氧化鯊烯環化酵素.....	62
3-3 新型具螢光探針抑制劑.....	63

3-3-1 螢光標定抑制劑對於酵素的抑制分析.....	63
3-3-2 溶劑對於螢光標定抑制劑的影響.....	65
3-3-3 螢光標定抑制劑的吸收光譜測量.....	66
3-3-4 螢光標定抑制劑的最大吸收波長的位移現象.....	68
3-3-5 螢光標定抑制劑的莫耳激發係數.....	69
3-3-6 不同溶液極性對 Ro4-DPA 的螢光放射光譜的影響.....	71
3-3-7 螢光探針 Ro4-DPA 與氧化鯊烯環化酵素的相互作用.....	72
3-4 螢光抑制劑與牛的氧化鯊烯環化酵素的入塢交互作用.....	76
<b>第四章 結論與未來展望.....</b>	<b>80</b>
<b>第五章 參考文獻.....</b>	<b>84</b>
<b>附錄</b>	
附錄一.....	91
附錄二.....	92
附錄三.....	95



## 圖目錄

圖 1-1 膽固醇的化學結構.....	2
圖 1-2 膽固醇在動物體內的生合成代謝途徑.....	3
圖 1-3 動物中氧化鯊烯環化酵素的催化反應.....	4
圖 1-4 四個物種的(氧化)鯊烯環化酵素胺基酸序列比對圖.....	5
圖 1-5 自然界中的(氧化)鯊烯環化酵素.....	6
圖 1-6 膽固醇與氧化膽固醇的生合成雙途徑.....	7
圖 1-7 鯊烯-蛇麻烯環化酵素的晶體結構圖.....	13
圖 1-8 蛇麻烯進入酵素活性空腔作為模板的空間立體圖.....	14
圖 1-9 Asp455 與 Cys456 及 Cys533 氫鍵拉扯誘導 Epoxide 開環.....	16
圖 1-10 氧化鯊烯環化酵素抑制劑 Ro48-8071 的化學結構式.....	17
圖 1-11 鯊烯-蛇麻烯環化酵素與抑制物 Ro48-8071 複合物共同的晶體結構.....	18
圖 1-12 蛇麻烯、Ro48-8071 及 LDAO 三者的重疊立體示意圖.....	19
圖 2-1 TLC 活性測試示意圖.....	41
圖 2-2 直鏈型質體 DNA 與酵母菌 genome 的重組作用.....	45
圖 2-3 受質 2,3-氧化鯊烯的合成途徑.....	48
圖 2-4 氧化鯊烯環化酵素抑制物 Ro 48-8071 的合成途徑.....	49
圖 2-5 螢光化合物及硼酸酯化後的螢光化合物.....	52
圖 2-6 具硼酸基的螢光化合物其硼酸酯化反應流程.....	53
圖 2-7 合成之螢光物標定 Ro48-4071.....	54
圖 2-8 利用 Suzuki coupling 反應合成 Ro4-DPA.....	55
圖 2-9 利用 Suzuki 偶合反應合成具螢光標定的 Ro48-8071.....	56
圖 3-1 Q-Sepharose 陰離子交換樹脂的管柱層析結果.....	59
圖 3-2 Hydroxyapatite Gel 的管柱層析結果.....	60
圖 3-3 牛肝中氧化鯊烯環化酵素純化的 SDS-PAGE 結果.....	61
圖 3-4 Ro48-8071 對於氧化鯊烯環化酵素的抑制作用.....	64
圖 3-5 螢光標定抑制劑對於氧化鯊烯環化酵素的抑制作用.....	64
圖 3-6 螢光標定抑制劑在 TLC 下以波長 365nm 光照.....	65

圖 3-7 螢光標定抑制劑在(a)DMSO 和(b)5 mM Kpi 下以波長 365nm 光照激發.....	65
圖 3-8 螢光化合物在 5mM Kpi / 0.1% TX-100 環境下吸收光譜範圍..	67
圖 3-9 在 5mM Kpi / 0.1% TX-100 的環境下的莫耳激發係數.....	70
圖 3-10 Ro4-DPA 在不同極性溶液環境下的的螢光放射光譜.....	71
圖 3-11 Ro4-DPA 在有/無與氧化鯊烯環化酵素混合的螢光放射光....	72
圖 3-12 不同濃度下 Ro4-DPA 的螢光放射光譜.....	73
圖 3-13 通去鹽管柱後所收集的部分經由 SDS-PAGE 分析銀染結果..	73
圖 3-14 去鹽管柱層析結果在波長 365nm 光照.....	74
圖 3-15 去鹽管柱層析結果的 BCA 分析.....	74
圖 3-16 去鹽管柱層析結果的螢光強度分析.....	75
圖 3-17 (a)Ro4-NA1 對牛的氧化鯊烯環化酵素進行入塢作用的結果與 (b)Ro4-NA2 對牛的氧化鯊烯環化酵素進行入塢作用的結果.....	78
圖 3-18 (a)Ro4-BP3 對牛的氧化鯊烯環化酵素進行入塢作用的結果與 (b)Ro4-BP4 對牛的氧化鯊烯環化酵素進行入塢作用的結果.....	78
圖 3-19 (a)Ro4-DPA 入塢作用的結果與 Ro48-8071 比對為不同位向且 (b)Ro4-DPA 的 50 個最佳計算結果皆與 Ro48-8071 不同位向.....	79

## 表目錄

表 1-1 比較脊椎動物和酵母菌中的氧化鯊烯-羊毛硬脂醇環化酵素的 純化效果及其特性.....	11
表 2-1 牛肝中氧化鯊烯環化酵素的純化流程.....	36
表 2-2 製作 SDS-PAGE 電泳膠片的配方.....	39
表 2-3 PCR 反應試劑的量.....	43
表 2-4 PCR 反應條件.....	43
表 2-5 甲基利用表現型態的篩選.....	45
表 2-6 Taq polymerase PCR 反應試劑用量.....	46
表 2-7 抑制劑與氧化鯊烯環化酵素抑制作用的流程圖.....	57



## 附錄

附錄一. 根據牛的 OSC 基因序列所設計的兩組引子用在 <i>Pichia</i> 表現系統中表現載體的構築.....	91
附錄二. Ro4-DPA 的 EI-MS 及 NMR 光譜分析.....	92
附錄三. Ro4-NA1、Ro4-NA2、Ro4-BP3、Ro4-BP4 的 EI-MS 及 NMR 光譜分析.....	95





# 第一章 緒論

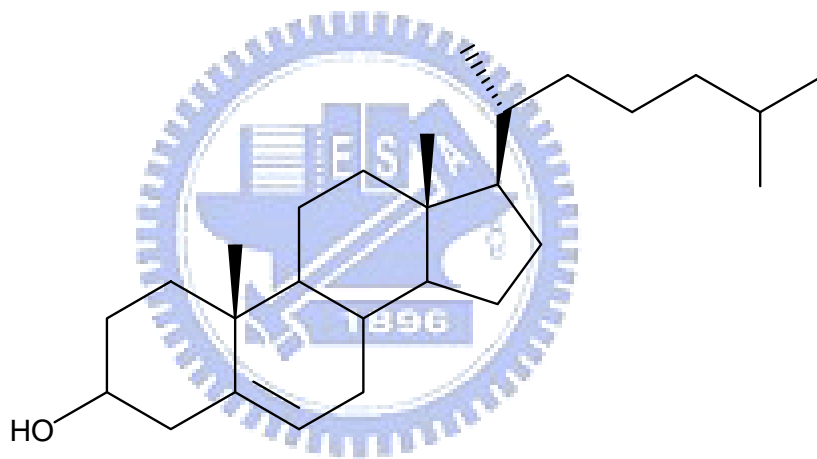
## 1-1 膽固醇的重要性

固醇類(Sterols)是多環脂醇類物質之通稱，以四或五個融合環(fused-rings)作為其結構的中心骨架，主要的差異僅在於支鏈上的長短或官能基的不同。固醇類可普遍存在於動物、植物和細菌中，而且彼此具有很相似的結構；在大多數真核細胞中，固醇類為細胞膜組成及生理調控上的重要脂質成分<sup>1</sup>。

在動物體內最常見的固醇類物質中，以膽固醇(Cholesterol)最為重要【圖1-1】；而膽固醇是一種類似脂肪的複合體，主要是由肝臟所製造產生，其次是在腸、腎上腺皮質及動脈管壁上生成，同時也可經由食物的攝取而獲得<sup>2</sup>。其廣泛的存在於動物體內，其中以腦及神經組織含量最為豐富。例如，在高等動物中，它是組成細胞膜的重要成分，可調控細胞膜的流動性，影響胞內外物質的滲透作用；另外，膽固醇也是膽汁、固醇類荷爾蒙、維生素D<sub>3</sub>、紅血球及神經組織等胞內生理代謝物質的重要前驅物。而膽固醇在體內代謝生成膽汁可以幫助脂質的消化及脂溶性維生素的吸收；人體也可利用膽固醇，自行合成脂溶性維生素D<sub>3</sub>，而維生素D<sub>3</sub>是一種具有激素功能的固醇，會影響鈣質吸收，造成血鈣與骨鈣的迴饋循環平衡，並刺激基因表現與增加骨質的強度<sup>3</sup>。此外，膽固醇也是脂質筏(Lipid raft)的組成成分。Lipid raft是指細胞膜中一塊固性區域，當細胞膜上膽固醇比例增加，細胞膜的流動性會減少，即一塊較不具流動性的富含膽固醇區域<sup>4</sup>。許多文獻的研究也指出，脂質筏(Lipid raft)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>。因此，膽固醇也同時參與了體內許多重要的生理調控作用。

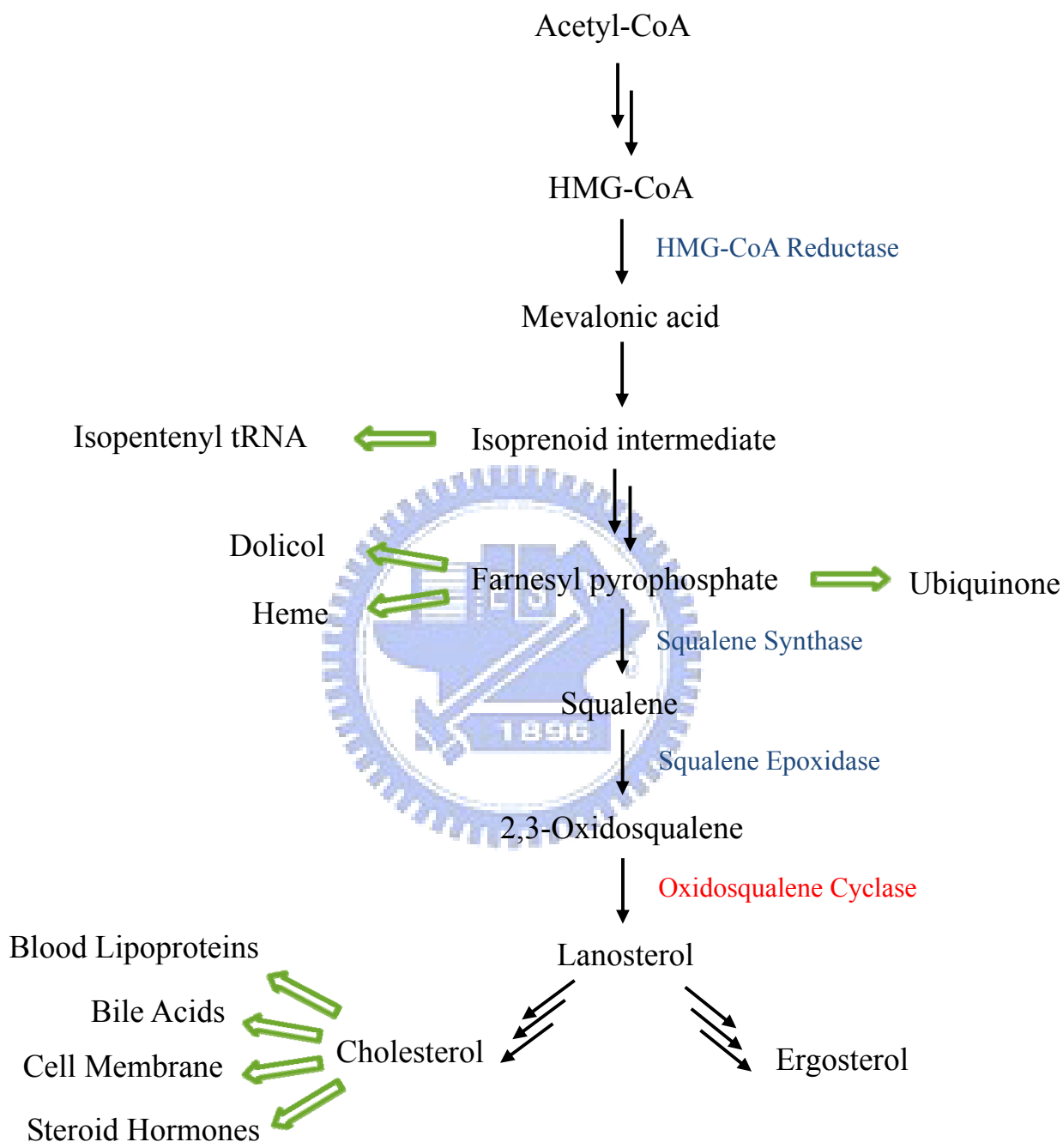
膽固醇在體內的運送需要藉由其與脂蛋白間的結合方式加以運送，可分為三種脂蛋白：(1) 非常低密度脂蛋白-膽固醇

(VLDL-cholesterol)，負責從肝臟將脂質攜帶至全身各組織，同時VLDL也會轉變為LDL；(2) 低密度脂蛋白-膽固醇(LDL-cholesterol)，將膽固醇運送至全身各部位，但若含量過高會對人體不利，因而被稱為「壞」的膽固醇，也是造成血管阻塞、硬化的元凶；(3) 高密度脂蛋白-膽固醇(HDL-cholesterol)，為一種對人體有利的膽固醇，可將黏在血管上多餘的膽固醇運送回肝臟代謝排除，降低血液中膽固醇的含量。由於現今人類生活習慣及飲食型態的改變，往往容易造成血液中膽固醇含量過高的情形，使得心血管疾病發生的機率大大提高。而心血管相關的疾病正是現今人類十大死因排行之一的高危險因子<sup>6-8</sup>；儘管膽固醇對於人類健康具有負面的影響，但也是體內不可或缺的生化代謝物質，因此需要有適當的含量比例才能夠維持人體正常機能的進行<sup>6</sup>。



【圖 1-1】膽固醇的化學結構

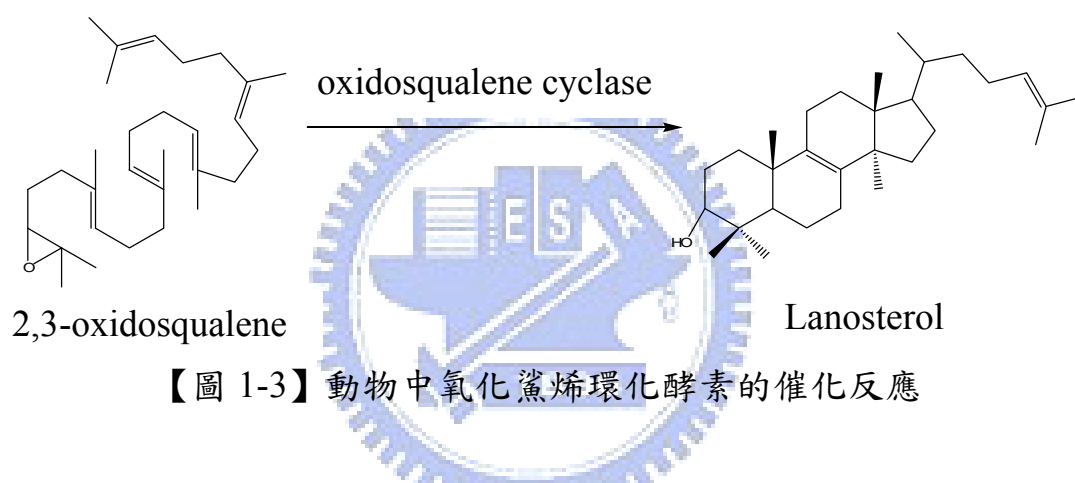
在動物體內，膽固醇的生合成是由兩個碳原子的乙醯輔酶A (Acetyl-CoA)開始，經由幾個步驟的反應縮合後，並經過速率決定步驟3-羥基-3-甲基戊二醯輔酶A還原酶 (HMG-CoA reductase)催化形成二羥甲基戊酸(Mevalonic acid)，再經一連串的ATP水解參與反應，生成異戊二烯類的中間物(Isoprenoid intermediates)，隨後六個五碳的異戊二烯單元體經過縮合及還原反應，產生疏水性的鯊烯(Squalene)，鯊烯再經由環化酶的作用，環化生成羊毛硬脂醇(Lanosterol)，最後再經過氧化、脫羧、還原等十多個步驟，而生成最終產物膽固醇<sup>3</sup>【圖 1-2】。



【圖 1-2】膽固醇在動物體內的生合成代謝途徑

## 1-2 氧化鯊烯環化酵素的簡介

直線型的氧化鯊烯經由氧化鯊烯環化酵素(OSC)的催化轉變成具有四環結構的羊毛硬脂醇之過程【圖 1-3】，被認為是膽固醇生合成途徑中最特別且令人感到興趣的步驟，因為此步驟是膽固醇生合成途徑中唯一的環化反應。而控制此過程的關鍵角色，即為氧化鯊烯環化酵素(oxidosqualene cyclase ; E.C. 5.4.99.-)。在整個氧化鯊烯環化酵素催化的過程中，包含了質子化(Protonation)、環化(Cyclization)、重組(Rearrangement)及消去(Elimination)等反應步驟，至少超過 10 個共價鍵的斷裂和生成，顯現出環化機制的高複雜性和高立體選擇性<sup>9</sup>。



【圖 1-3】動物中氧化鯊烯環化酵素的催化反應

以真菌*S. cerevisiae* OSC酵素分別與*C. albicans* OSC酵素、植物*A. thaliana* CAS酵素及細菌*A. acidocaldarius* SHC酵素三者作胺基酸序列比對(Alignment)後，發現彼此相同度達到63%、36%及16%【圖 1-4】，其中又以C-端區域較N-端的胺基酸序列更為相近<sup>10</sup>；另外，將人類的氧化鯊烯環化酵素分別與真菌*S. cerevisiae*和*C. albicans* OSC酵素加以比對後，也具有36.0%和36.1%的相同度<sup>11</sup>。由已知資料庫的電腦分析，氧化鯊烯環化酵素在胺基酸序列上具有許多相似的區段，例如[K/R][G/A]X<sub>2-3</sub>[F/Y/W][L/I/V]X<sub>3</sub>QX<sub>2-5</sub>GXW此16個胺基酸在序列上重複了相當多次，其中在第10和第16個位置主要是Q和W所構成(Q表示麩醯胺酸Glutamine；W表示色胺酸Typtophan)，所以此序列又稱為Q-W功能區域(Q-W motif)<sup>12</sup>。研究發現，如果Q-W功能區域遭受改變或阻隔後，會造成酵素活性明顯降低，因此推論Q-W功能區域對

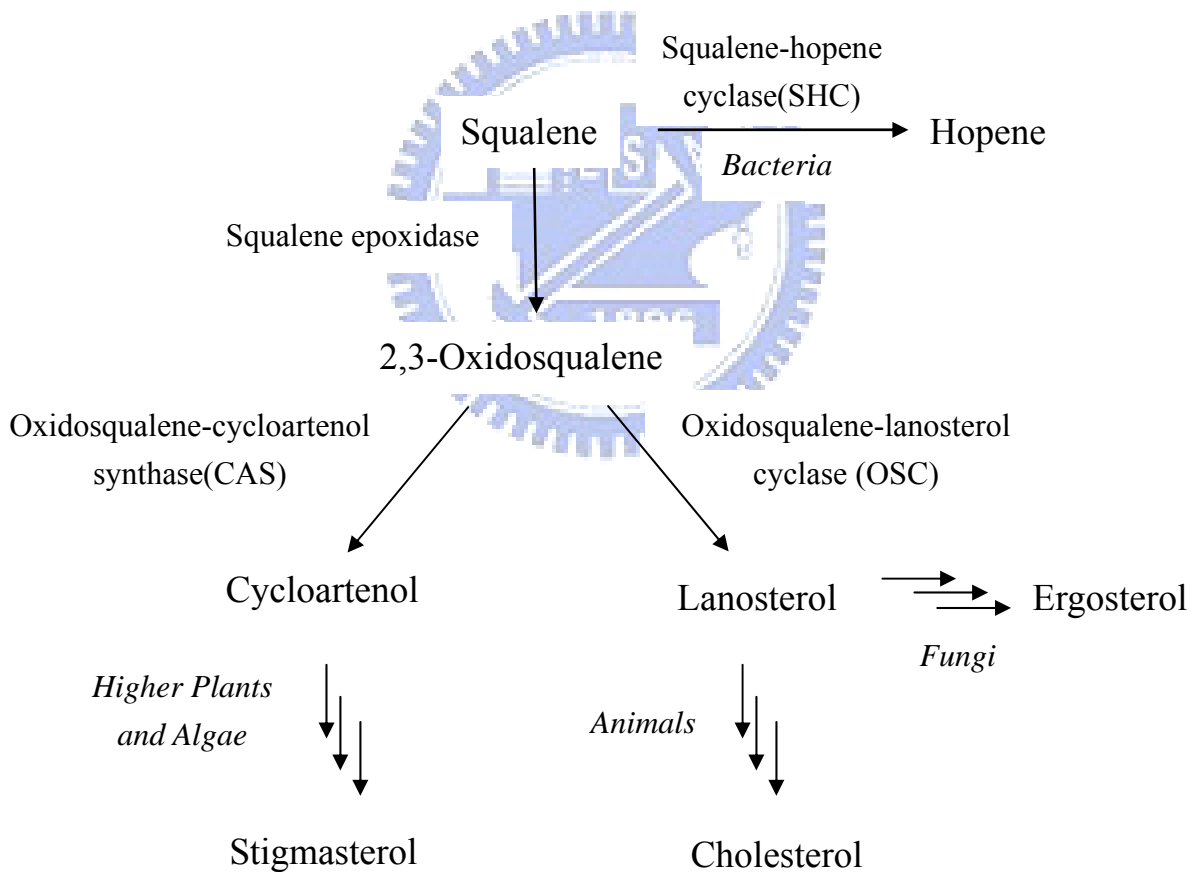


於氧化鯊烯環化酵素的催化功能具有重要的影響力，一般認為環化酵素的Q-W功能區域與酵素催化過程中程涉及的十幾個鍵的斷裂、生成所釋放的焓(enthalpy)有關，可能是藉由電子轉移過程吸收反應過多的能量來穩定酵素結構<sup>13</sup>。

Hs OSC	MTEGTCLRRR	GGPYKTEPAT	DLGR..WRLN	.....	.CERGROTWT	...YLODERA	G...REOTGL	EAYALGLDTK	61
At CAS	MWKLKIAEG.	GSPWLRNTNN	HVGRQFWEFD	PNLGTPELDA	AVEEARKSFS	DNRFVQKHS	DLLMRLQFSR	ENLISPVLPQ	79
Sc OSC	.....TEF	YSDTIGLPKT	DPRL..WRLR	.....	TDELGRESWE	...YLTPQQA	ANDPPSTFTQ	WLLQDPKFPQ	58
Aa SHC	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
Hs OSC	NYFKDLP.KA	HTAFEGALN.	GMTFYVGLQA	ED.GHWTGDY	GGPLFLLPGL	LITCHVARIP	...LPAGYRE	EIVRYLRSVQ	135
At CAS	VKIEDTDDVT	EEMVETTLKR	GLDFYSTIQA	HD.GHWPGDY	GGPMFLLPGL	IITLSITGAL	NTVLSEQHKQ	EMRRYLHNQ	158
Sc OSC	HPVDGGWGLH	SVDKSTVFGT	VLNYVILRLL	G.LPKD.HPV	CAKARSTLLR	LGGAIQSPHW	GKIWLSALNL	YKVEGVNPA	135
Aa SHC	.MAEQLV.EA	PAYARTLDR.	AVEYLLSCQK	DE.GYWWGPL	LSNVTMEAEY	VLLCHILD.	...VDRDRME	KIRRYLLEHQ	71
		α1		β1		α2		α3	
Hs OSC	LP.DGGWGLH	IEDKSTVFGT	ALNYVSLRIL	GVGP.D.DPD	LVRARNILHK	KGGAVALPSW	GKFWLAVLNV	YSWEGLNTLF	212
At CAS	NE.DGGWGLH	IEGPSTMFSG	VLNYVTLRLL	GEGPNDDGDG	MEKGRDWILN	HGGATNITSW	GKMWLSVLGA	FEWSGNNLPL	237
Sc OSC	PETWLLPYSL	PMHPGRWVH	TRGVYIPVSY	L.SLVKFCSPM	TPLLEELRNE	IYTKPFDKIN	FSKNRNTVCG	VDLYPHSTT	293
Aa SHC	RE.DGTWALY	PGGPPDLDTT	IEAYVALKYI	GMSR.D.EEP	MOKALRFIQS	QGGIESSRVF	TRMWLALVGE	YPWEKVPMPV	148
		α4		α5		α6			
Hs OSC	PEMWLFPDWA	PAHPSTLWCH	CRQVYLPMSY	CYAVRLSAAE	DPLVQSLRQE	LYVEDFASID	WLAQRNNVAP	DELYTPHSWL	292
At CAS	PEIWLPLYFL	PIHPGRMWC	CRMVYLPMSY	LYGKRFVGP	TSTVLSLRKE	LFTVPYHEVN	WNEARNLCAK	EDLYYPHPLV	317
Sc OSC	PETWLLPYSL	PMHPGRWVH	TRGVYIPVSY	L.SLVKFCSPM	TPLLEELRNE	IYTKPFDKIN	FSKNRNTVCG	VDLYPHSTT	293
Aa SHC	PEIMFLGKRM	PLNIYEFGSW	ARATVVVALSI	VMSRQP....	...VFPLPER	ARVPELYETD	VPPRRR.GAK	GGGGWIFDAL	220
		α7						α8	
Hs OSC	LRVVYALLN.	...LYEH	SAHLRQRAVQ	.KLYEHIVAD	DRFTKSISIG	PISKTNIMLV	RWYVDGPAST	AFQEHVSRIP	366
At CAS	QDILWASLHK	IVEPVLMRWP	GANLREKAIR	.TAIEHIHYE	DENTRYICIG	PVNKVLNMLC	CWVED.PNSE	AFKLHLPRH	395
Sc OSC	LNIANSLVV.	...FYEKYL	RNRFIYLSK	KKVYDLIKTE	LQNTDSLCA	PVNOAFALV	TLIEEGVDSE	AFQRLQYRFK	368
Aa SHC	DRALHGQYK.	...LSVHPF	RRAAEIRALD	.WLLERQAGD	GSWGG.IQPP	WFYALIALKI	LDMTQHPAFI	KGWEGLELYG	293
		α9			α10			α11	
Hs OSC	DYLWMLDGM	KMQGTNGSQI	WDTAFAIQAL	LEAGGHRPE	FSSCLQKAHE	FLRLSQVDPN	PP.DYQKYR	QMRKGGFSFS	445
At CAS	DFLWLAEDGM	KMQGYNGSQL	WDTGFAIQAI	LATN..LVEE	YGPVLEKAHS	FVKNSQVLED	CPGLDNYWYR	HISKGAWPFS	473
Sc OSC	DALFHGPQGM	TIMGTVGVT	WDCAFAIQYF	FVAGLAERPE	FYNTIVSAYK	FLCHAQFDTE	CV...PGSYR	DKRKGAWGS	445
Aa SHC	VELDYG..GW	MFOAS.ISPV	WDTGLAVLAL	RAAG...LPA	DHDRLVKAGE	WLLDRQIT.V	PG.DWAVKRP	NLKPGGFAFQ	365
		β2	β3		α12	α13			
Hs OSC	TLDCGWIVSD	CTAEALKAVL	LL..QEKCPH	VT.EHIPRER	LCDAVAVLLN	MRNPD....G	GFATYETKRG	GHLLELLNPS	518
At CAS	TADHGWPISD	CTAEGKKAAL	LL..SKVPKE	IVGEPIDAKR	LYEAVNVIIIS	LQNA....G	GLATYELTRS	YPWLELINPA	547
Sc OSC	TKTQGYTVAD	CTAEAIKAI	MVKNSPVFSE	VH.HMISSER	LFEQIDVLLN	LQNIQSFEYG	SFATYEKIKA	PLAMETLNPA	524
Aa SHC	FDNVYYPDVD	DTAVVVWALN	TL..RLPD..	...ERRRRDA	MTKGRFVIWG	MQSSN....G	GWGAYVDVN.	TSDLPNHIFP	433
		α14			α15				
Hs OSC	EVFGDIMIDY	TYVECTSAVM	QALKYFHKRF	PEHRAAEIRE	TLTQGLEFCR	RQQRADGSE	GSWVCFTYTG	TWFGLEAFAC	598
At CAS	ETFGDIVIDY	PYVECTSAAI	QALISFRKLY	PGHRKKEVDE	CIEKAVKFIE	SIQAADGSWY	GSWAVCFTYTG	TWFGVKGLVA	627
Sc OSC	EVFGNIMVEY	PYVECTDSSV	LGLTYFHKYF	.DYRKEEIRT	RIRIAIEFIK	KSQLPDGSWY	GSWGICFTYA	GMFALEALHT	603
Aa SHC	CDFGEVT.DP	PSEDVTAHVL	ECFGSFG...	...YDDAWK	VIRRAVEYLK	REQKPDGSWF	GRWGVNYLYG	TGAVVSALKA	505
		α16			α17		α18		
Hs OSC	MGQTYRDGTA	CAEVSRACDF	LLSRQMDAGG	WGEDFESCEE	RRY..LQSAQ	SQIHNTCWAM	MGLMAVRHPD	IEAQ..ERGV	674
At CAS	VGKTLKN...	SPHVAKACEF	LLSKQQPSGG	WGESYLSCQD	KVYSNLDGNR	SHVVNTAWAM	LALIGAGQAE	VDRKPLHRAA	704
Sc OSC	VGETYEN...	SSTVTRKGCDF	LVSKQMKDGG	WGESMKSSSEL	HSY..VDSEK	SLVVQTAWAL	IALLFAEYPN	KEVI..DRGI	676
Aa SHC	VGIDTRE...	.PYIQKALDW	VEQHQNPDGG	WGEDCRSYED	PAY..AGKGA	STPSQTAWAL	MALTAGGRAE	SEAA..RRGV	577
		α19				α20		α21	
Hs OSC	RCLLEKQLPN	GDWPEQENIAG	V.FNKSCAIS	YTSYRNIFPI	WALGRFSQLY	PERALAGHP.			732
At CAS	RYLINAQMEN	GDFPQOEIMG	V.FNRNCMIT	YAAYRNIFPI	WALG...EY	RCQVLLQQGE			759
Sc OSC	DLLKNRQEEES	GENKFESVEG	V.FNHSCAIE	YPSYRFLFPI	KALGMYSRAY	ETHTL....			730
Aa SHC	QYLVETQRPD	GGWDEPYTGT	TGFPDGFYLG	YTMRYRVFPT	LALGRYKQAI	ERR.....			630
			β4	β5		α22			

【圖1-4】對於*H. sapiens* OSC (Hs)、*A. thaliana* CAS (At)、*S. cerevisiae* OSC (Sc)及 *A. acidocaldarius* SHC (Aa)四個物種的氧化鯊烯環化酵素胺基酸序列比對圖。具有顏色部份表示對於*H. sapiens* OSC及 *A. acidocaldarius* SHC兩個酵素所預測的二級結構，紅色區塊代表  $\alpha$ -Helix 結構，黃色則代表  $\beta$ -Sheet 結構<sup>14</sup>。

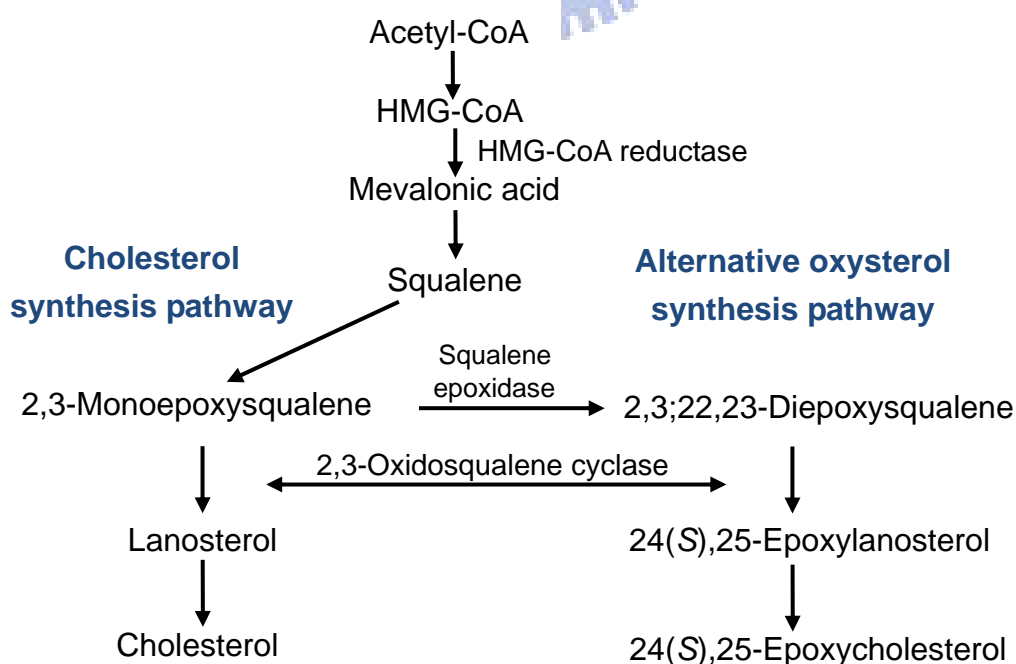
三萜類的環化酵素家族是由一群功能相近的同源(Homologous)酵素所組成【圖 1-5】，在不同物種中的氧化鯊烯環化酵素，可催化產生具多樣性(Diversity)及複雜性(Complexity)的產物結構，並且保有各物種間的專一性及演化性。在哺乳類動物與真菌中，氧化鯊烯環化酵素(oxidosqualene-lanosterol cyclase, OSC)能將氧化鯊烯轉變成羊毛硬脂醇，進而在哺乳類動物中生成膽固醇，在真菌中則產生麥角脂醇(Ergosterol)；在高等的植物和海藻中，則透過功能相近的環化酵素(cycloartenol synthase, CAS)催化產生環阿屯醇(Cycloartenol)；而就大多數的原蟲類和細菌而言，鯊烯不需要先經由環氧化步驟形成氧化鯊烯，便可直接作為受質，藉由鯊烯蛇麻烯-環化酵素(squalene-hopene cyclase, SHC)催化生成蛇麻烯(Hopene)<sup>9, 15</sup>。



【圖 1-5】自然界中的(氧化)鯊烯環化酵素

### 1-3 降低膽固醇藥物的新目標-氧化鯊烯環化酵素

由於氧化鯊烯環化酵素可以催化直線型的2,3-氧化鯊烯經由環化及骨架重排反應生成羊毛硬脂醇，此產物為膽固醇生合成途徑中，第一個出現具四環結構固醇類化合物的前驅物<sup>16</sup>。除此之外，此酵素也催化肝X受體(liver X receptor, LXR)的活化並且對於24(S),25-氧化膽固醇的生成進行調控。抑制氧化鯊烯環化酵素，會使得24(S),25-氧化膽固醇的量增加，且進一步降低膽固醇的生成。因此，根據膽固醇生合成的雙機制發現<sup>17</sup>【圖1-6】，抑制氧化鯊烯環化酵素不但可以降低血液中低密度脂蛋白-膽固醇(LDL-cholesterol)的含量，並且可以進一步的避免大量的低密度脂蛋白-膽固醇(LDL-cholesterol)被巨噬細胞吞噬(macrophage)，並沉積在動脈壁的血管內膜中，造成動脈粥樣硬化(atherosclerosis)的發生<sup>2, 6-8</sup>。根據近幾年來在專一性抑制劑、定點突變與利用同源性高的細菌鯊烯-蛇麻烯環化酵素(squalene-hopene cyclase, SHC)進行分子模擬的研究以及人類氧化鯊烯環化酵素晶體結構等實驗的研究基礎下，此反應機制在過去五十幾年中，已經被相當程度的探討與解釋<sup>18-20</sup>。並且更加確認此酵素作用的機制，相信未來對於設計新的降低膽固醇藥物會有很大的幫助。



【圖 1-6】膽固醇與氧化膽固醇的生化合成雙途徑



### 1-3-1 氧化鯊烯環化酵素為抑制膽固醇生成的目標蛋白

由於氧化鯊烯環化酵素在膽固醇生合成途徑中扮演很重要的角色，其不僅能催化2,3-氧化鯊烯轉變成為羊毛硬脂醇，也可以在另一個氧化固醇類生合成途徑中將2,3;22,23-雙氧化鯊烯催化形成24(S),25-氧化膽固醇<sup>21</sup>。另外，2,3;22,23-雙氧化鯊烯跟2,3-氧化鯊烯比較下，對於氧化鯊烯環化酵素有較低的Km值，所以在部分抑制氧化鯊烯環化酵素的情況下，24(S),25-氧化膽固醇較膽固醇易被生成<sup>22</sup>。另外，24(S),25-氧化膽固醇也可以很有效的活化肝X受體(LXR)<sup>23</sup>，進而增強細胞中調控脂質代謝的許多重要基因的表現，包含三磷酸腺苷結合盒A1(ATP-binding cassette A1, ABCA1)、三磷酸腺苷結合盒G1(ATP-binding cassette G1, ABCG1)、三磷酸腺苷結合盒G5(ATP-binding cassette G5, ABCG5)和三磷酸腺苷結合盒G8(ATP-binding cassette G8, ABCG8)等。而這些基因也都牽涉細胞中膽固醇的流出，並進一步促進固醇調節因子結合蛋白1c(sterol response element binding protein 1c, SREBP-1c)、脂肪酸合成酶(fatty acid synthase)和脂蛋白分解酶(lipoprotein lipase)的表現<sup>24</sup>。

另外，經由從前的研究結果發現，24(S),25-氧化膽固醇不僅僅可以抑制3-羥基-3-甲基戊二醯輔酶A(HMG-CoA)的活性，同時也可以促進3-羥基-3-甲基戊二醯輔酶A(HMG-CoA)的減少，進而產生一個協同的、自我限制的負調控<sup>25-29</sup>。由此可知，當我們部分抑制氧化鯊烯環化酵素的活性，會促進氧化固醇類化合物的生成，接著更進一步的抑制膽固醇的生成。

在體外實驗中已經被證實，如果24(S),25-氧化膽固醇的生成增加，會阻斷固醇調節因子結合蛋白(sterol response element binding protein, SREBP)的活性，包含固醇調節因子結合蛋白-1(SREBP-1)<sup>23</sup>和固醇調節因子結合蛋白-2(SREBP-2)<sup>30</sup>。另外抑制氧化鯊烯環化酵素，會抑制固醇調節因子結合蛋白-2(SREBP-2)活化3-羥基-3-甲基戊二醯

輔酶A(HMG-CoA)的能力，進而抑制膽固醇生成<sup>28</sup>。

在動物實驗中也發現分別餵食倉鼠(Hamsters)、松鼠猴(Squirrel monkeys)和阿根廷小型豬(Göttingen minipigs)氧化鯊烯環化酵素抑制劑Ro48-8071並且與未餵食抑制劑的控制組動物做比較，發現血液中低密度脂蛋白-膽固醇(LDL-cholesterol)的量降低了約30~35%<sup>27</sup>。因此在小型動物體的實驗中發現，氧化鯊烯環化酵素的抑制確實能夠降低血液中低密度脂蛋白-膽固醇的量。經由許多的研究證明，氧化鯊烯環化酵素確實很有潛力用來發展設計降膽固醇藥物。

### 1-3-2 抑制氧化鯊烯環化酵素造成的雙機制調控作用

近年來，Telford 等人對於利用氧化鯊烯環化酵素抑制劑來調控大型動物的脂蛋白B(apolipoprotein B)代謝的機制上很有成果<sup>31</sup>，脂蛋白B(apolipoprotein B)為低密度脂蛋白(LDL)和非常低密度脂蛋白(VLDL)的主要結構蛋白。利用新發展出來的氧化鯊烯環化酵素抑制劑Ro0714565對迷你豬所做的相關研究中，發現血液中低密度脂蛋白-脂蛋白元B(LDL-apoB)濃度大量的減少，並且非常低密度脂蛋白-脂蛋白元B(VLDL-apoB)分泌至血液中的量也減少許多，更造成肝臟中膽固醇濃度降低，進而增加肝臟中低密度脂蛋白受體(LDL receptor)和HMG-CoA reductase的表現量<sup>17</sup>。而且LXR基因表現量的增加也會增強ABCG5和ABCG8基因在肝臟和腸中的表現。另外，研究指出在肝臟中三酸甘油脂的濃度沒有受到氧化鯊烯環化酵素抑制劑的影響，這也就是說脂肪酸和三酸甘油脂的生成是不會因為氧化鯊烯環化酵素的活性被抑制而有所影響。由此可知，透過膽固醇生合成雙機制的的作用，抑制氧化鯊烯環化酵素的活性，不但可以降低低密度脂蛋白-膽固醇的量，也可調控體內總膽固醇的含量。

## 1-4 氧化鯊烯環化酵素的酵素學

藉由傳統蛋白質純化(Purification)或是經由重組基因的蛋白質表現系統，目前已有許多物種的環化酵素可順利被純化得到<sup>32</sup>；但由過去的研究發現氧化鯊烯環化酵素其低穩定性及需與膜結合(membrane-bound)的特性，需要加入適量的介面活性劑(Detergent)和鹽類濃度來維持純化過程中的酵素活性，以提高酵素純化的效率，造成酵素純化技術上的困難度增加，進而影響到對於氧化鯊烯環化酵素的發展。目前，氧化鯊烯環化酵素已經有從牛肝、鼠肝、豬肝中直接純化取得【表 1-1】，另外還有藉由基因轉殖技術而從酵母菌(yeast)、甲醇酵母菌(pichia pastoris)以及昆蟲細胞表現系統(baculovirus expression system)等不同的蛋白質表現系統表現出來。

氧化鯊烯環化酵素首先是從植物中純化所得到<sup>33</sup>，分別為 氧化鯊烯-環阿屯醇環化酵素(oxidosqualene-cycloartenol cyclase)和 $\beta$ -香桂素合成酵素( $\beta$ -amyrin synthase)，研究中發現在添加非離子性清潔劑(Triton X-100)之後，能夠大幅提高氧化鯊烯環化酵素的活性，且以具有活性的可溶性酵素形式存在；根據前述的實驗方法，由哺乳類動物老鼠的肝臟中也純化出氧化鯊烯-羊毛硬脂醇環化酵素<sup>34</sup>，純化倍率可達到 1,800 倍，並由 SDS-PAGE 上觀察到分子量約為 75 kDa，為往後的鼠肝(78 kDa)<sup>35</sup> 及豬肝(75 kDa)的純化研究奠定一個良好的基礎<sup>36</sup>。

第一個對於氧化鯊烯環化酵素具有良好抑制效用的不可逆抑制劑 29-methylidene-2,3-oxidosqualene(29-MOS)在 1991 年時最早被研發出來；利用 29-MOS 能與氧化鯊烯環化酵素形成共價鍵結合的原理，將不同物種中的肝臟粗萃取液分別與 [<sup>3</sup>H]-29-MOS 作用，而進行放射性同位素的親和力標記(Affinity-labeling)實驗，並藉由西方墨點法(Western blotting)的技術，可推得哺乳類動物如豬、狗及人類的氧化鯊烯環化酵素分子量大小為 75 kDa、73 kDa 及 73 kDa 【表 1-1】<sup>36</sup>。

另外，將鼠肝中氧化鯊烯環化酵素所相對應的基因序列，利用分子選殖(Cloning)的技術，從酵母菌中成功地分離出erg7基因<sup>35</sup>；並可順利獲得氧化鯊烯環化酵素的開放解讀序列(open reading frame, ORF)，包括終止密碼子在內共含有2196個核苷酸，可轉譯為731個胺基酸，分子量約為83.4 kDa的酵素<sup>10</sup>。

而在實驗室過去學長姐的努力之下，我們成功地從牛肝中純化到氧化鯊烯-羊毛硬脂醇環化酵素，其分子量約為80 kDa，純化得到的活性倍率較細胞微粒體時的比活性明顯增加了700多倍<sup>37</sup>。

物種	參考文獻	酵素分子量	比活性
脊椎動物			
豬	11	-	256 nmol/hr/mg
豬	36	75 kDa	2643 nmol/hr/mg
老鼠	36	78 kDa	-
狗	36	73 kDa	-
人	36	75 kDa	-
老鼠	34	75 kDa	436 $\mu$ kat/mg
老鼠	35	65 kDa	58 pmol/min/mg
牛	37	80 kDa	1747 pmol/min/mg
真菌類			
酵母菌	10	83.4 kDa	-

【表 1-1】比較脊椎動物和酵母菌中的氧化鯊烯-羊毛硬脂醇環化酵素的純化效果及其特性<sup>38</sup>。



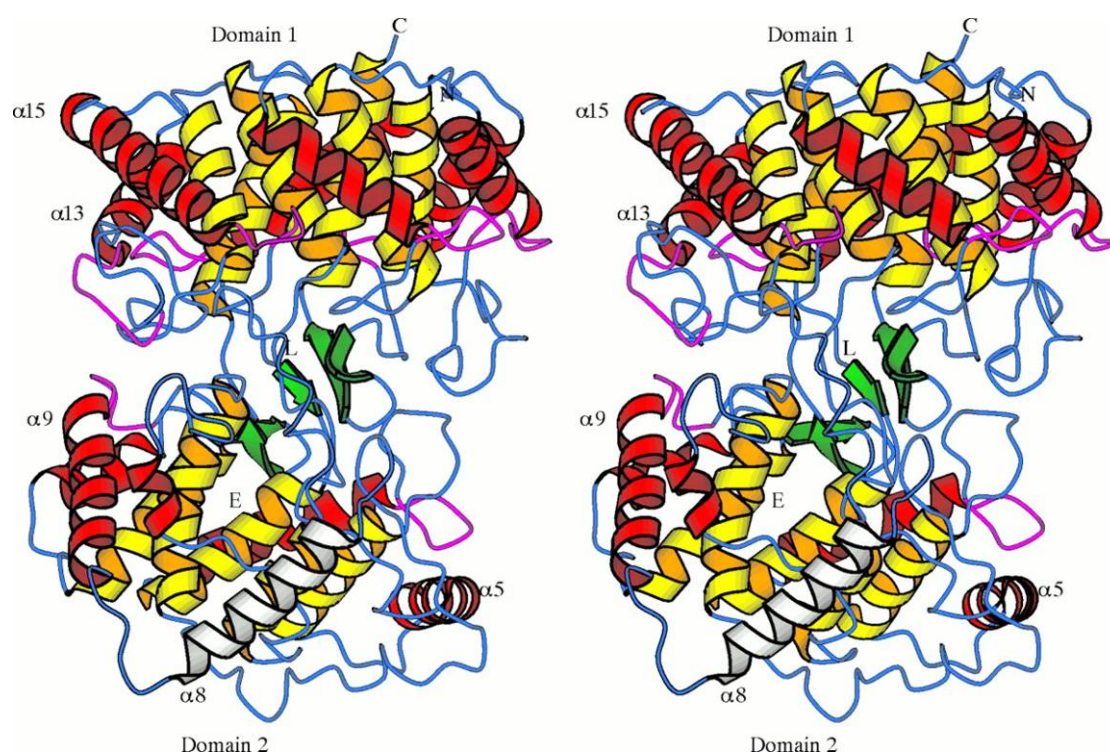
## 1-5 鯊烯-蛇麻烯環化酵素的晶體結構

細菌(*Alicyclobacillus acidocaldarius*)中的鯊烯-蛇麻烯環化酵素(SHC)的晶體結構，發表在 1997 年的 *Science* 期刊上【圖 1-7】，對於研究三萜類(氧化)鯊烯環化酵素而言，可說是一項非常重大的突破<sup>18</sup>。因為鯊烯-蛇麻烯環化酵素，可將鯊烯環化形成蛇麻烯，與哺乳類動物氧化鯊烯-羊毛硬脂醇環化酵素(OSC)的功能很相近，因此推測兩者在酵素結構上也可能彼此非常接近，且經由胺基酸序列的比對後，證實此兩種環化酵素之間確實具有 20 ~ 26% 的相同度<sup>10</sup>，所以根據鯊烯-蛇麻烯環化酵素的晶體結構，同時也給予了有關氧化鯊烯-羊毛硬脂醇環化酵素在空間結構上的良好參考依據。

由鯊烯-蛇麻烯環化酵素的晶體結構中，顯示出一個同型雙倍體(homo-dimeric)的嵌入式膜蛋白質(integral membrane protein)；單元體(Subunit)彼此互相環繞成兩個類似啞鈴形的結構區域(Domain)，並以  $\alpha$ -Helix 構形為主【圖 1-7】；其中 Domain 1 形成了  $\alpha_6$ - $\alpha_6$  的圓桶狀結構，而 Domain 2 則可能會嵌入於 Domain 1 的空間，也形成了一個  $\alpha$ - $\alpha$  的圓桶狀，此兩個特殊區域透過一些環線(Loops)與五條較短的  $\beta$ -Sheet 結構，組合出中空的活性區通道，約有 1200 ~ 1600 Å 的空間範圍，此凹陷的活性空腔(Active cavity)位置，能夠藉由空間旁的胺基酸互相配合，而產生具有協調性的運動，有利於受質與產物在酵素內的進入與釋出<sup>18</sup>。

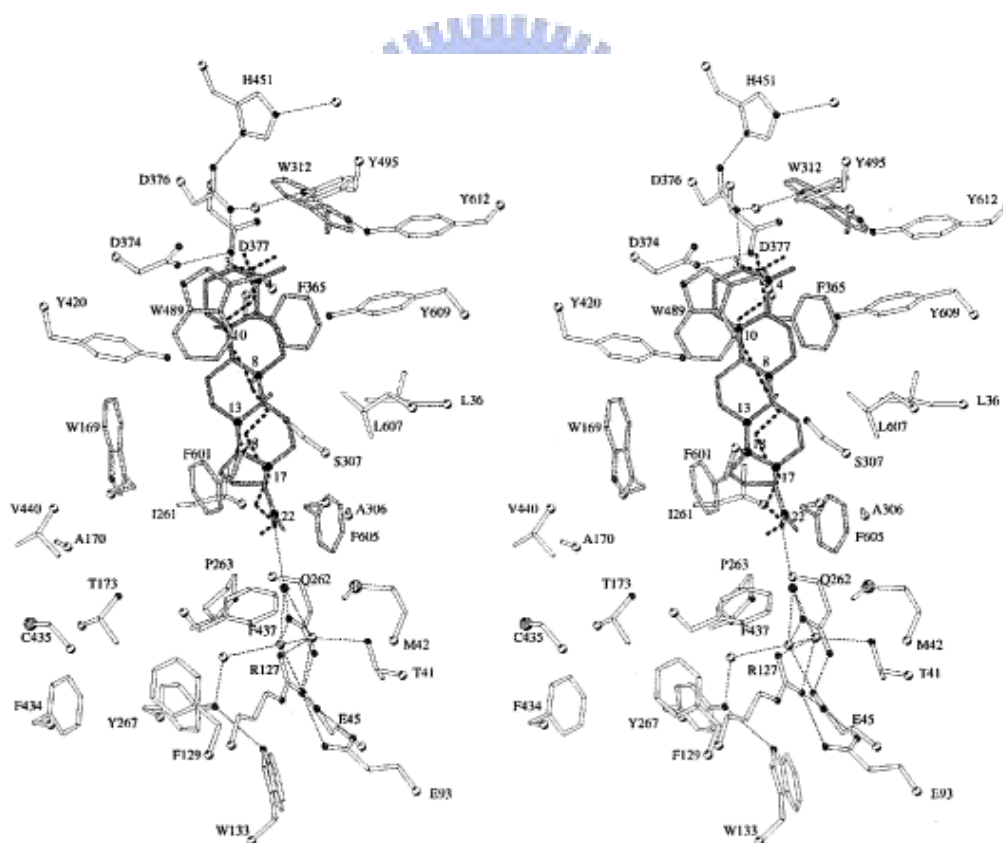
根據酵素極性區域的分佈，活性區通道周遭以芳香環胺基酸的組成佔了大多數，如：Trp312、Trp489、Tyr495、Phe601、Tyr609及Tyr612等相關位置，形成了一個深邃的非極性(Nonpolar)空腔，及一段可與細胞膜作銜接的疏水性(Hydrophobic)平版結構，另外芳香環胺基酸由於具有多電子的特性，而產生能夠穩定反應過程中碳陽離子中間產物(carbocation intermediates)的作用，同時這些芳香環胺基酸組成也高度保留在其他許多種(氧化)鯊烯環化酵素中。此外，雖然酵素的活性空

腔附近主要是非極性胺基酸，然而卻在空腔頂端(Asp376 附近)和底部(Glu45 附近)出現了小範圍的極性區域，與非極性的活性空腔形成強烈的對比；因此，從空間上推斷，帶正電性頂端部分可能與起始反應的質子化有關，而極性底部則可能導致環化結束前的去質子化反應；而位於兩極性旁的微小空間，則可能是水分子協助催化作用之處。



【圖1-7】鯊烯-蛇麻烯環化酵素的晶體結構圖，N、C、E 及 L 分別代表了胺基酸序列的 N 端、C 端、受質入口及抑制劑作用位置；黃色為內部  $\alpha$ -Helix 結構，紅色為外部  $\alpha$ -Helix 結構，綠色為  $\beta$ -Sheet 結構，紫色為 Q-W motif，而白色表示非極性  $\alpha 8$  區域<sup>18</sup>。

將細菌(*A. acidocaldarius*)中的鯊烯-蛇麻烯環化酵素與酵母菌(*S. cerevisiae*)中氧化鯊烯-羊毛硬脂醇環化酵素兩者加以比較，發現兩者擁有由空腔頂端的高相似性(higher homology)向底部位置逐漸降低，反而形成低相似性(lower homology)的特性【圖1-8】。鯊烯-蛇麻烯環化酵素與抑制劑LDAO(*N,N*-dimethyldodecylamine-*N*-oxide)的作用，進一步地確定了活性空腔的存在以及極性頂端的區域是在序列DXDD motif 的附近(胺基酸 374~377)，而此位置正好與酵素的起始反應位置相當接近，所以極性的頂端推測為具有提供質子的功用，可引發鯊烯的雙鍵與其進行反應，進而產生一連串環化過程的一個重要因素，其中又以Asp376位置的作用最為顯著(而在酵母菌中的相對位置Asp456也發現相當重要)<sup>18, 33</sup>。

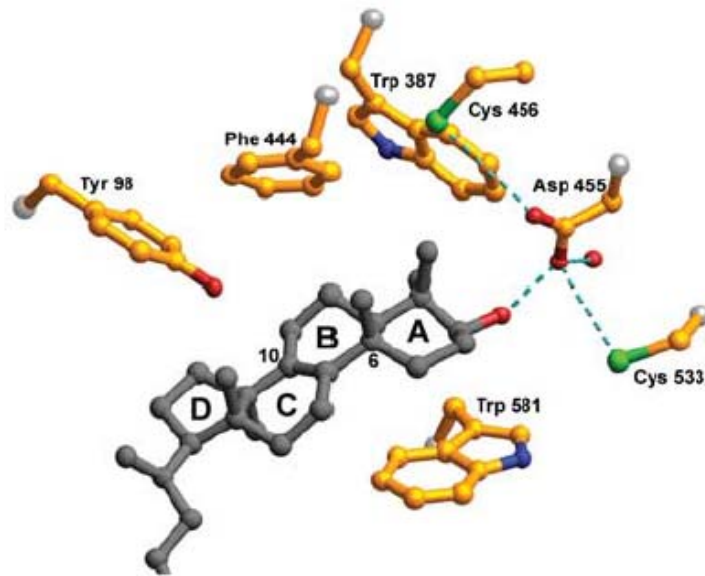


【圖1-8】以蛇麻烯進入酵素活性空腔作為模板的空間立體圖，其中黑色線條表示蛇麻烯，虛線表示抑制劑 LDAO，灰色代表空腔周圍重要的胺基酸位置，預測的水分子位置以灰色圓圈表示；在活性空腔的頂端為一極性區域，底部則形成極性網狀結構<sup>39</sup>。



另一個由晶體結構中的重要發現，則是觀察到許多高度保留性的 Q-W motif 於鯊烯-蛇麻烯環化酵素中，共重複了八次(氧化鯊烯環化酵素中也重複了五次)<sup>18</sup>；這些高度保留性的 Q-W motif 在晶體結構中大多數是位在兩個  $\alpha$ - $\alpha$  構形的連接處，雖然並不是座落於活性中心內，而只是圍繞在酵素的表面部分，但是胺基酸 Q 與 W 的側鏈可以藉由互相堆疊而產生氫鍵與疏水性作用力的複雜網狀特性，而分別與相鄰的或連接的  $\alpha$ -Helix 結構發生作用，使得所有的  $\alpha_6$ - $\alpha_6$  及部分的  $\alpha$ - $\alpha$  構形能夠互相連接形成一個穩定且緊密的圓桶狀結構，同時也可以吸收催化作用時多餘的反應能量，而在催化過程中達到穩定酵素結構的功用<sup>39</sup>。

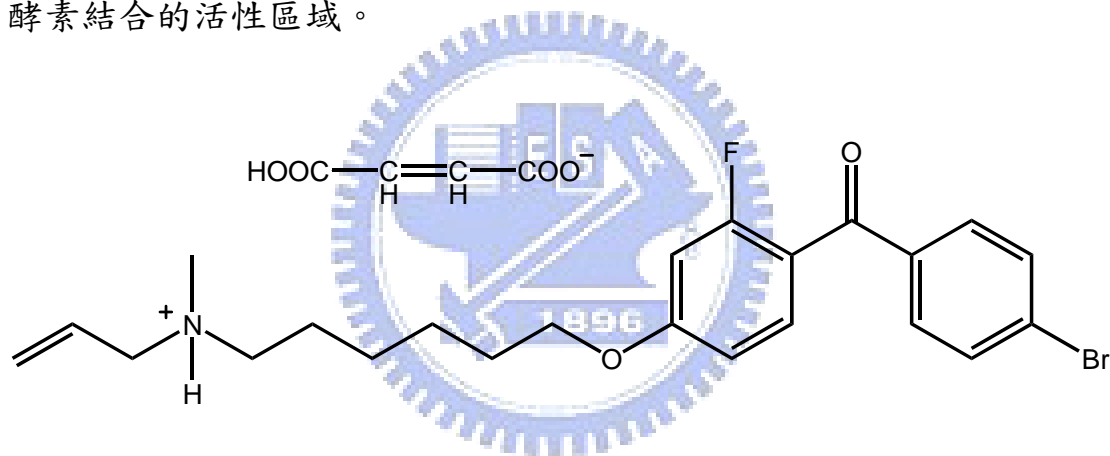
同屬於三萜類環化家族的鯊烯-蛇麻烯環化酵素(SHC)常被用以做為了解氧化鯊烯環化酵素(OSC)環化機制的結構模組，但此同源性結構模組有其限制性。而人類的氧化鯊烯-羊毛硬脂醇環化酵素之 X-ray 晶體結構、酵素的活性區域及活性區胺基酸基團可能參與的反應機制，目前已經正式發表在 2004 年 Nature 期刊中<sup>20</sup>。經先前文獻的研究證明氧化鯊烯環化酵素催化氧化鯊烯經由環化反應生成四環的羊毛硬脂醇，是透過活性區上的 Asp455 酸催化開環，使環氧基(Epoxyde)的氧被質子化而有環化起始反應，同時也建構了酵素中催化環化反應過程<sup>40</sup>。因此，利用人類氧化鯊烯環化酵素(OSC)的 X-ray 晶體結構，可發現氧化鯊烯環化酵素(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，進而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【圖 1-9】。



【圖 1-9】Asp455 與 Cys456 及 Cys533 的氫鍵拉扯效應幫助受質氧化  
 鯊烯上之官能基 Epoxide 誘導開環; Trp387、Phe444、Trp581  
 穩定 A 環形成與 B 環形成的 C-6、C-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>20</sup>

## 1-6 鯊烯-蛇麻烯環化酵素與抑制物Ro48-8071複合物的晶體結構

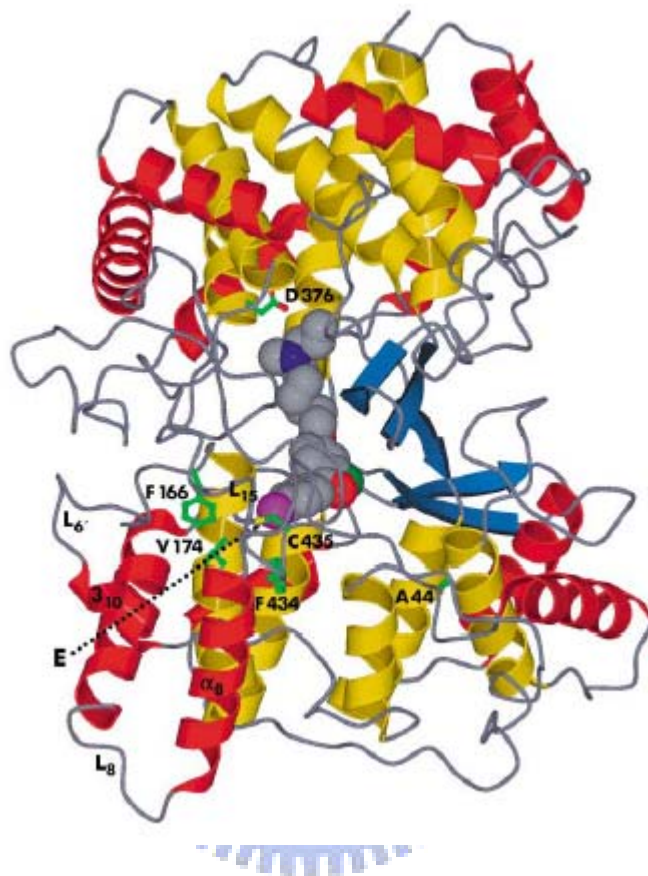
目前Ro48-8071對於人類肝細胞中氧化鯊烯-羊毛硬脂醇環化酵素是一個很有效的抑制劑【圖1-10】，其結構主要由二苯甲酮(benzophenone (BP) moiety)，六碳長鏈間隔(hexacarbon spacer)及四級胺(quaternary ammonium group) 三個部分所組成<sup>27</sup>；Ro48-8071對於人類肝細胞在體外(*in vitro*)動力學的試驗中顯示，其IC<sub>50</sub>可達到6.5 nM，在老鼠肝細胞中也有40 nM的效果，而對於細菌中的鯊烯-蛇麻烯環化酵素IC<sub>50</sub> 則有9.0 nM的效果<sup>33</sup>；此外，Ro48-8071的抑制方式推測為非抑制型(Noncompetitive)的抑制，表示其作用位置應不同於受質與環化酵素結合的活性區域。



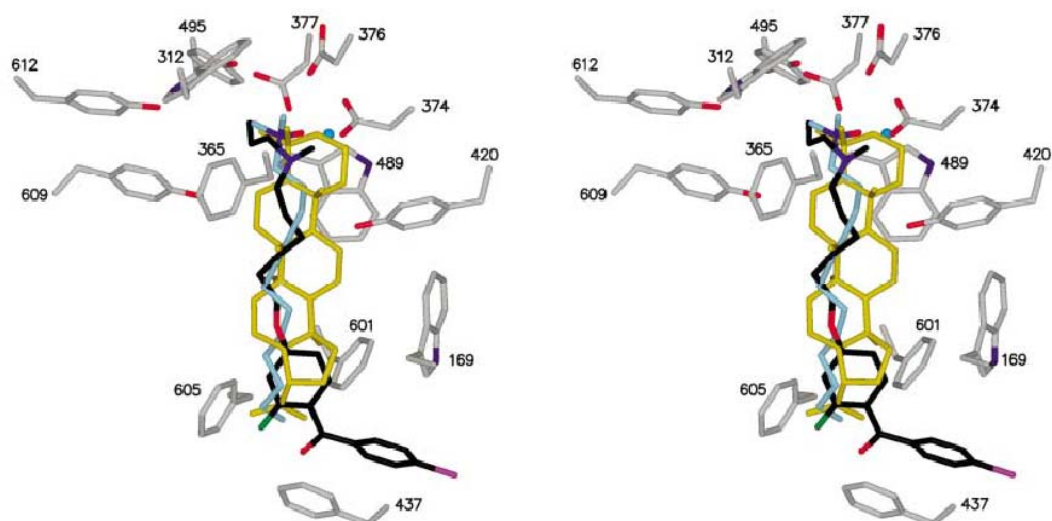
【圖1-10】 氧化鯊烯環化酵素抑制劑Ro48-8071的化學結構式

透過鯊烯-蛇麻烯環化酵素與抑制劑Ro48-8071複合物的晶體結構上可以發現，在細菌中的鯊烯-蛇麻烯環化酵素，胺基酸Phe129正好在受質進入酵素的開口通道結構處，可以穩定Ro48-8071其溴(bromo-)取代基位置；氟(flouro-)取代基則是模擬水分子的位置，可以提供氫鍵的特性；帶正電性的四級胺位置，則與受質接受質子化的區域相當鄰近，其正電荷證實能夠被Trp489、Trp312和Phe365等芳香環胺基酸以 cation- $\pi$  interactions 的力量所穩定；長鏈狀的hexacarbon則可藉由其非極性的特點使得Ro48-8071更加深入酵素的活性中心；位於 bezophenone上的C=O官能基，則經由Phe605的芳香環以其高密度

的  $\pi$  電子力量達到穩定【圖1-11】；因此，整個Ro48-8071的結構都被化學作用力所包圍，Phe166、Val174、Phe434、及Cys435更是緊密束縛住活性空腔的立體結構，維持空間形狀而不受到影響<sup>41</sup>。



【圖1-11】鯊烯-蛇麻烯環化酵素與抑制物Ro48-8071複合物共同的晶體結構，灰色部份代表Ro48-8071，E 為 Ro48-8071進入的路線，以虛線表示， Asp376 則推測為環化反應起始的位置<sup>42</sup>。



【圖1-12】蛇麻烯、Ro48-8071及 LDAO 三者的重疊立體示意圖，其中產物蛇麻烯為黃色，Ro48-8071為黑色，及 LDAO 為淺藍色；周圍的數字則表示可穩定活性中心結構的相關胺基酸位置<sup>42</sup>。

除此之外，利用與受質結構類似的蛇麻烯或LDAO對於鯊烯-蛇麻烯環化酵素進行入塢試驗，並比較其與鯊烯-蛇麻烯環化酵素-Ro48-8071的結構複合體之間的差異，可以發現三者活性空腔內的相對位置十分相似，可以證實抑制物模擬受質結構所產生的抑制作用是可行的；而根據其空間鄰近相對應的胺基酸，也可判斷其在與受質結合或是能夠穩定活性中心及進行催化過程中所需扮演的角色【圖1-12】；然而，有些結果卻是與之前實驗相左，如Ala44位置在利用放射性物質親和力標記的實驗中被推測是相當重要的<sup>41</sup>，但從Ro48-8071複合物的晶體結構卻發現Ala44與Ro48-8071之間的距離達到14 Å，已遠超過了可進行氫鍵或其他分子作用力的距離，反而是在Ala44旁的Glu45位置還更加靠近抑制物，而且由空間上判斷，Ala44似乎是朝向酵素外緣的，而非位在活性空腔內。因此，氧化鯊烯環化酵素與Ro48-8071複合物的相關實驗除了可以提供另一個不同於複合物晶體結構的探討方向，更進一步的了解受質與酵素在真實環境下所進行的作用機制，同時也可以與過去實驗結果相互比較，除了能印證現有已知的研究，也能夠對於實驗相異之處提供合理的解釋。並對於研究氧化鯊烯-羊毛硬脂醇環化酵素的催化機制，提供了另一個新的研究的方向。



## 1-7 利用嗜甲醇酵母菌*Pichia pastoris*表現外來蛋白

早期蛋白質表現系統的發展大多以大腸桿菌(*E. coli*)宿主系統為主，主要的原因是大腸桿菌(*E. coli*)具備培養簡單且實驗操作方便的優點。但該系統無法表現出經過真核細胞後轉譯修飾過之正確構形的蛋白質。而在另一方向以酵母菌表現系統來說，*Saccharomyces cerevisiae*是近幾十年來最常被使用於表現外來蛋白質的酵母菌之一，主要是因為*S. cerevisiae*的許多基因序列、胞器及其功能和高等真核生物(higher eukaryotes)，甚至人類的細胞相同，並具備高等真核細胞特有的後轉譯修飾作用(post-translational modification)。所以，有越來越多的研究利用酵母菌表現系統表現哺乳類動物蛋白。但是利用*S. cerevisiae*表現外來蛋白質，較常發生的問題是表現具分泌性蛋白時常會出現過度醣基化(hyperglycosylation)的現象，造成外來蛋白的產量通常只有細胞總蛋白的1-5%。另外，若表現的外來蛋白對細胞造成緊迫(stress)的現象時，也常造成基因穩定性的降低，尤其是所表現的蛋白質如果對酵母菌具有毒性時，這種外來基因不穩定現象會更加明顯<sup>43, 44</sup>。許多研究也發現，以*S. cerevisiae*來表現分泌性蛋白質時，表現蛋白會有很高的比例和宿主細胞的蛋白以結合的形式存在，使得表現量降低<sup>45-47</sup>。因此，許多的替代性的酵母菌表現系統也陸陸續續的被提出，如：*Pichia pastoris*<sup>48</sup>、*Hansenula polymorpha*<sup>49</sup>、*Schizosaccharomyces pombe*<sup>50</sup>、*Yarrowia lipolytica*<sup>51</sup>、*Kluyveromyces lactis*<sup>52</sup>及*Schwanniomyces occidentalis*<sup>53</sup>。

### 1-7-1 *Pichia pastoris* 對甲醇的代謝作用

在1969年，Ogata等人研究發現，酵母菌*Pichia pastoris*是一種利用甲醇(methanol)做為其唯一碳源並供給自身所需能量的嗜甲醇(methylotrophs)酵母菌<sup>54</sup>。*P. pastoris*對甲醇的代謝是由酒精氧化酶(alcohol oxidase, AOX)來啟動，甲醇在進入過氧化體(peroxisome)後經酒精氧化酶(alcohol oxidase, AOX)催化後分解成甲醛(formaldehyde)和過氧化氫(hydrogen peroxide)，因過氧化氫對細胞有毒性，故此步驟必須在過氧化體(peroxisome)中發生。由於AOX對氧(O<sub>2</sub>)的親和性低，因此酵母菌必須大量的合成此一酵素以執行其功能。酒精氧化酶(AOX)的產生是由*P. pastoris*基因體上的AOX1和AOX2 兩個基因表現而來，但大部份參與酒精代謝反應的酒精氧化酶(AOX)均是由AOX1來表現，是最主要代謝甲醇的酵素<sup>55</sup>。AOX1可被甲醇誘導及調節其表現，且酒精氧化酶(AOX)僅有在甲醇存在的環境下才能恆定大量表現<sup>56, 57</sup>，如有其它碳源(如glucose、glycerol等)存在時，即偵測不到來自酒精氧化酶(AOX)的存在。而*P. pastoris*在以甲醇培養時，其利用甲醇的反應路徑中第1個酵素AOX1可以被大量合成並持續佔細胞可溶性蛋白質總量的30%的特性<sup>58</sup>，因此可以利用AOX1基因的啟動子來控制外來基因的表現。以*P. pastoris*表現系統表現外來基因大致分有三個重要的步驟，(1) 表現載體之構築；(2) 表現質體轉型transformation作用；(3) 表現酵母菌株之篩選。目前已有許多不同特性的表現載體以及宿主酵母菌株可依所表現蛋白之特性而選擇所需之材料。



## 1-7-2 *Pichia pastoris* 之表現載體

構成 *P. pastoris* 表現載體的主要核酸結構有 origin、expression cassette 和 select marker 三個部分。表現卡匣(Expression cassette)，包括有一個啟動子(promoter)和轉錄終止序列(transcription termination)，且在這兩個序列之間有一段具有數個限制酵素切位的外來基因插入序列(multiple cloning site)。目前在 *P. pastoris* 表現載體中常用的啟動子有下列四種：(1) 代謝甲醇 AOX 酵素之啟動子 PAOX1，在僅有甲醇存在時才會啟動及表現；(2) 代謝 glycerol 的 GAP 酵素(glyceraldehydes-3-phosphatedehydrogenase)之啟動子 PGAP，亦是 *P. pastoris* 之強啟動子之一(strong-promoter)<sup>59</sup>。因不需用甲醇來誘導即可持續表現，故應用在所表現之蛋白不能含有有害物質(如石油相關化學物)之食品等級蛋白；(3) 表現 glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase 基因之啟動子 PFLD1，是由甲醇或是甲胺(methylamine)誘導表現之啟動子<sup>60</sup>(4) PPEX<sup>61</sup>和 PYPT1<sup>62</sup>是表現力較弱的啟動子，應用在表現量不能太高之蛋白的表現時。目前常使用的篩選基因(select marker)有 HIS4 胺基酸基因與 Zeocin 抗藥性基因。若在載體上帶有一段 HIS4(histidine dehydrogenase)基因和 AOX1 基因的啟動子部份及其上、下游基因序列<sup>63</sup>時，當質體插入宿主之染色體上，便可以使這重組之 *P. pastoris* 菌株能在不含有 histidine 的培養基上生長，而 AOX1 基因序列是提供使載體能夠以 homologous recombination 之方式交換至宿主基因體之 AOX1 基因上；而 Zeocin 抗藥性基因是源自於 *Sh ble* (*Streptoalloteichus hindustanus* Ble) 基因，它所表現之蛋白會和抗生素 Zeocin 結合而使之失去作用，並可以利用菌株對不同劑量 Zeocin 之抗藥性來粗略的判斷所轉形菌株 expression cassette 之多寡<sup>64</sup>。另外，Zeocin 是 bleomycin 類之抗生素，所以對酵母菌和大腸桿菌均有抑制生長的作用。

### 1-7-3 表現質體之嵌入 (integration) 染色體之作用方式

*P. pastoris*表現系統並非使用游離基因(episome)形式的載體，所以外來的表現載體皆採取嵌入(integrate)的方式插入至*P. pastoris*酵母菌的基因體中，而這種方式插入的外來基因可穩定的存在菌株中。而將表現載體嵌入酵母菌染色體的方式有兩種：第一，是single crossover type insertion event，為表現載體藉由AOX1或His4啟動子序列直接利用同質重組(homologous recombination)的方式將表現載體嵌入酵母菌染色體中；第二，則是以單一刀口切割於表現質體之標示基因(如AOX1及His4之promoter 5'端)內，質體DNA會以Ω狀的插入方式和酵母菌基因體上相同基因序列進行同質重組(homologous recombination)，但此種方法可能會導致原先之AOX1基因產生缺陷，因而使轉形後之*P. pastoris*重組菌株其甲醇利用率降低<sup>55</sup>。通常傳送質體DNA進入酵母菌的方法以原生質球狀體作用(spheroplasting)及電孔作用(electroporation)兩種方法的效率較高<sup>65</sup>。而利用聚乙二醇1,000(PEG 1,000)或是氯化鋰(lithium chloride)的方式則效率較低。

### 1-7-4 *Pichia pastoris* 之蛋白質後修飾作用 (post-translational modification)

酵母菌表現系統和大腸桿菌表現系統最大的不同點就是酵母菌會進行與高等真核生物相似的蛋白質後修飾作用(post-translational modification)，例如辨識訊息序列(signal sequence)、蛋白質的摺疊(folding)、雙硫鍵(disulfide bond)的形成、蛋白質水解作用(proteolytic)以及O-和N-linked的糖基化(glycosylation)。*P. pastoris*本身所產生的分泌蛋白非常少，即使有，其產量也很低，故以分泌形式產生的外來表現蛋白會成為培養上清液中主要的蛋白。目前被使用在表現載體上的PHO1 (acid phosphatase signal)是由*P. pastoris*分離的分泌序列，已成功的用在外來蛋白的表現。許多外來蛋白本身的分泌序列亦能成功的應用在*P. pastoris*中，但仍是以*S. cerevisiae*中分離的 $\alpha$ -factor效果最理想

<sup>66</sup>。α-factor 序列乃由19個胺基酸序列所構成，其中有三個N-linked糖基化的位置及一個Kex2 endopeptidase作用切位<sup>67</sup>，可在分泌後自動切去α-factor序列。另外，在過去的經驗中，有一些蛋白無法以PHO1或是α-factor來形成分泌型式之蛋白，故須由蛋白本身分泌序列進行突變<sup>68</sup>或是以合成分泌序列<sup>69</sup>的方式來達成。

由上述我們可歸納出，選擇以*Pichia pastoris*表現系統來表現外來蛋白質具以下之優點：(1) *P. pastoris*的糖基化程度僅8~9個mannose，不會有高度糖基化之缺點；(2) *P. pastoris*很容易便能藉由發酵而達到很高的酵母菌濃度；(3)*P. pastoris*所使用的質體是屬於插入性質體 (integrative plasmid)，藉由這種質體帶著外來基因插入在其染色體上，可以提高外來基因的穩定性，使在大規模培養時不會由於基因的不穩定而使產量降低<sup>70</sup>。



## 1-8 研究動機與目的

這幾十年來的臨床研究已經證實低密度脂蛋白(low density lipoproteins, LDL)對於膽固醇在體內的運送扮演相當重要的角色<sup>6</sup>；由於隨著生活型態的改變，導致人類飲食習慣及食物的改變，造成現在許多人都有膽固醇過高的現象以及困擾，同時血液中的膽固醇含量也往往會與高膽固醇症(hypercholesterolemia)、動脈粥狀硬化(atherosclerosis)、及心血管疾病(cardiovascular diseases)的發生有著密不可分的關聯<sup>2, 6-8</sup>，另一方面，血漿中低密度脂蛋白的升高與冠狀動脈心臟病(coronary heart disease)的相互關聯性已經被確定，而且膽固醇的降低也證實了對於避免冠狀動脈心臟病的發生有很好的效果。且經由臨床醫學的研究指出接受降低膽固醇療程的許多心肌梗塞(myocardial infarction)存活者、患有心絞痛(angina pectoris)的患者和其他患有動脈粥狀硬化症(atherosclerosis)的病人其症狀都獲得了相當的改善<sup>27</sup>。而針對血液中過高的膽固醇含量，目前藥物治療的方向主要是針對體內肝臟的膽固醇合成途徑進行抑制，其中大多數又以催化速率決定步驟的酵素 HMG-CoA reductase 作為抑制的目標<sup>6, 71</sup>，就目前而言是以 Statins 類藥物為主；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，繼而影響具重要生理功能的二次代謝物的形成與調節，如血基質(Heme)、長萜醇(Dolichols)和泛醌(Ubiquinone)等【圖二】，而有較嚴重的副作用產生<sup>72</sup>。例如，近幾年以肌毒性的產生較為大眾所關注，包含肌病變中的肌肉疼痛或無力等症狀，更有一部分服用此 Statins 類藥物的患者併發高致命性的橫紋肌溶解症(Rhabdomyolysis)，且併發肌毒性的機轉也未完全的明確。

因此，我們需要繼續設計更有效及更安全的新式降膽固醇藥物，以改善現有藥物的不足；而這幾十年來氧化鯊烯環化酵素的研究特別對於其催化受質進行環化/重排反應的反應機制和其對於設計抗真菌劑(antifungal)、降膽固醇藥物(hypocholesterolemic)等的化學治療劑其應用潛力感到興趣<sup>9, 38, 73</sup>。因為羊毛硬脂醇可說是首先具有固醇類特



有的四環中心結構，調控羊毛硬脂醇生成的酵素即是氧化鯊烯環化酵素，若能夠有效地抑制其催化作用，相對地就能夠降低膽固醇的生成。另一方面，由於氧化鯊烯環化酵素位在代謝途徑較下游的位置，且部分抑制其酵素活性也會促進膽固醇生合成雙機制的的作用，使得24(S),25-氧化膽固醇的量增加，進而抑制膽固醇的生成，另外也希望可以降低使用後副作用的產生；且由於氧化鯊烯-羊毛硬脂醇環化酵素只存在於動物及真菌中，現在已有許多藥廠針對此酵素發展出抗真菌(antifungal)的藥物<sup>74</sup>，具有相當良好的效果；因此，未來不論是發展可以降低高膽固醇症或是抗真菌的藥物，都將是非常具有市場競爭力的研究方向。

從以往的研究發現，(氧化)鯊烯環化酵素家族以鯊烯或氧化鯊烯作為受質，分別依循不同反應路徑，形成了許多相似卻不相同的中間物，造成各物種間代謝產物的差異結果，對於這類具有複雜性(Complexity)、效率性(Efficiency)及立體選擇性(Stereo-selectivity)的環化酵素，利用分生定點突變技術來研究突變的氧化鯊烯環化酵素的演化以及影響產物多樣性的因素，用以解釋氧化鯊烯環化酵素在環化機制和酵素結構兩者之間的關聯性<sup>15, 73</sup>；對於了解氧化鯊烯環化酵素催化環化和重排反應的機制有很重大的貢獻，並且對於酵素催化機制的了解也有助於抑制劑的設計跟研發。

細菌(*A. acidocaldarius*)中的鯊烯-蛇麻烯環化酵素的晶體結構在1997年被發表<sup>18</sup>；另外，T. Dang等人利用同位素標定的抑制劑Ro48-8071與細菌(*A. acidocaldarius*)中的鯊烯-蛇麻烯環化酵素作用<sup>41</sup>，藉以推斷受質與酵素進行作用的位置，其與固態的結晶結構的結論上有些許爭議<sup>42, 75</sup>。在此，提供了另一個不同於結晶結構的研究討論方向，即真實酵素存在環境與固態結晶的狀態中結構與受質的相對運動作用的情形是否會一致；而M. Stahl等人則利用電腦模擬的方法將兩酵素的序列進行比對<sup>14</sup>，探討主要活性區域的差異性，藉以瞭解兩者在序列上、功能上及結構上產生演化差異的原因。此結果在研究



氧化鯊烯環化酵素的酵素構造及催化機制上提供了很好的參考依據，對於探討結構-功能關係間的影響也具有重大的突破。

本論文的實驗目標則是希望藉由發展一種新型式且具螢光性質的抑制劑與氧化鯊烯環化酵素作結合，利用螢光的特性來偵測抑制劑與酵素之間的相互作用關係，以獲得更多有關哺乳類動物中氧化鯊烯環化酵素活性區結構上的特性，並希望能夠對於酵素的催化反應機制及受質進入酵素的通道和活性區相關胺基酸之間的作用有更進一步的瞭解，且進而對於設計降低膽固醇生成的藥物提供一個良好的發展方向。



## 第二章 實驗材料及方法

### 實驗材料

#### 2-1 實驗材料與藥品

Benzamidine

Fumaric acid

Lanosterol (LA)

N-bromosuccinimide (NBS)

Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)

Silver nitrate

Triton X-100 (TX-100)

以上皆購自於 Sigma。

4-Bromobenzoyl chloride

1,6-Dibromohexane

N-allylmethylamine

以上皆購自於 Fluka。

3-Fluoroanisole

以上皆購自於 Aldrich。

Naphthalene-1-boronic acid

Naphthalene-2-boronic acid

Biphenyl-3-boronic acid

Biphenyl-4-boronic acid

以上皆購自於 Alfa。

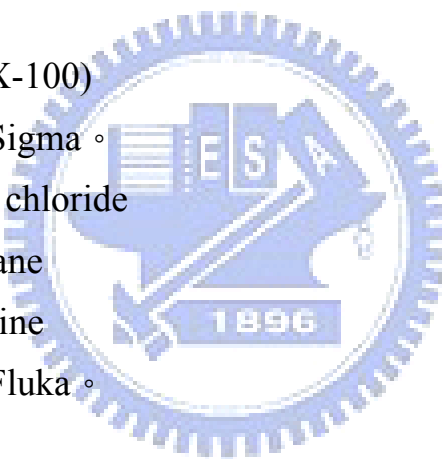
Hydrobromic acid 48%

以上皆購自於 Riedel-de Haen。

Acetic acid

Aluminum chloride

Coomassie brilliant R250



Cyclohexane  
Dichloromethane  
Diethyl ether  
Di-potassium hydrogen phosphate (KPi)

EDTA·Na<sub>2</sub>

Ethanol (95% and 99%)

Ether

Ethyl acetate (EA)

Hydrochloric acid 37%

Hexane

Hydroxylamine 50% (HA)

Isobutanol

Methanol

Nitrobenzene

N,N-dimethylacetamide

Potassium chloride (pellet)

Potassium carbonate

Sodium bicarbonate

Sodium carbonate

Sodium sulfate

Tetrahydrofuran (THF)

Trichloroacetic acid (TCA)

以上皆購自於 Merck。

Squalene 99%

p-Anisaldehyde

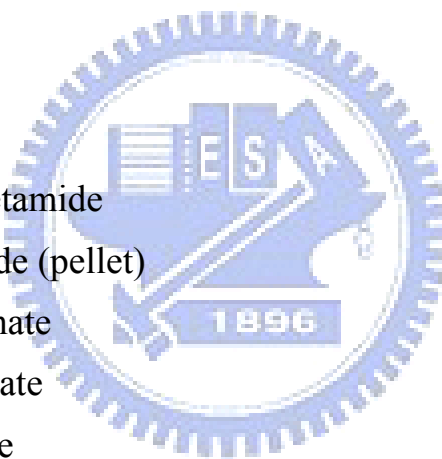
pinacol

4-(4,5-diphenyl-1H-imidazol-2-yl)phenylboronic acid (DPA)

以上購自於 ACROS。

Glycerol

Tris-(hydroxymethyl) methylamine



以上皆購自於 BDH。

Acrylamide

Dithiothreitol (DTT)

N,N'-Methylene-bis-acrylamide

Millipore polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane

Q-Sepharose Fast Flow Gel

HiTrap Heparin column

以上皆購自於 Amersham Pharmacia Biotech。

Hydroxyapatite HT Gel

以上購自於 Bio-Rad。

Ammonium persulfate (APS)

Sodium dodecylsulfate (SDS)

以上皆購自於 Gibco BRL。

Chromatography Silica Gel 200~450 mesh

以上購自於 Fisher。

BCA Proteins Assay Kit

以上購自於 Pierce。

牛肝 (Bovine Liver)

取自台中肉品屠宰場以及桃園肉品屠宰場，並保存於 -80 °C 冰箱中。



## 2-2 緩衝溶液與實驗溶液的配置

Homogenization Buffer I (HB I) , 4 L , pH = 7.4 :

含有 100 mM Tris-base 、 1 mM EDTA- $\text{Na}_2$  、 1 mM DTT 、 1 mM Benzamidine 及 40  $\mu\text{g}$  /mL PMSF 。

Homogenization Buffer II (HB II) , 4 L , pH = 7.4 :

含有 20 mM Tris-base 、 1 mM EDTA- $\text{Na}_2$  、 1 mM DTT 、 1 mM Benzamidine 及 40  $\mu\text{g}$  /mL PMSF 。

Ion Exchange Buffer (IEB) , 4 L , pH = 7.4 :

含有 20 mM Tris-base 、 1 mM EDTA- $\text{Na}_2$  、 1 mM DTT 、 1 mM Benzamidine , 40  $\mu\text{g}$  /mL PMSF 及 0.5 % TX-100 。

Hydroxyapatite Buffer (HAB) 與 Heparin Buffer (HB) , 4 L , pH = 7.4 :

含有 5 mM KPi (磷酸氫二鉀) 、 1 mM DTT 及 0.5 % Triton X-100 。

30% Polyacrylamide/ 1% Bisacrylamide :

5g N,N'-Methylene-bis-acrylamide 加入 375mL 40% Arcrylamide , 加二次水至 125mL

20% SDS 溶液 :

取 10g Sodium Dodecyl Sulfate(SDS) , 加入二次水至 50mL

1.5M Tris(pH 8.8) :

取 91g 的 Tris 加入去離子水至 500mL , 調整 pH 值至 8.8

1M Tris(pH 6.8) :

取 61g 的 Tris 加入去離子水至 500mL , 調整 pH 值至 6.8



10% APS :

取 1g Ammonium Persulfate，加入去離子水至 10mL

5X Sample Buffer :

取 0.5mL 1M Tris(pH 6.8)、0.8mL Glycerol、0.8mL 20% SDS 溶液，在加入 0.4mL  $\beta$ -Mercaptoethanol、0.2mL 0.05% Bromophenol Blue 加入去離子水至 10mL

SDS Running Buffer :

取 14.4g Glycine、3g Tris、1g SDS 再加入去離子水至 1L

膠片染色液 (0.1 % Coomassie blue R-250 Stain Solution) :

取 1 g 的 Coomassie brilliant blue R-250，溶於 400 mL 的甲醇中，再加入 100 mL 的醋酸，加二次水至體積為 1 L。

脫色溶液 I (Destain Solution I) :

將甲醇 400 mL 與醋酸 100 mL 混合後，加二次水至體積為 1 L。

脫色溶液 II (Destain Solution II) :

將甲醇 50 mL 與醋酸 70 mL 混合後，加二次水至體積為 1 L。

TLC 染劑 (酵素活性測試用)，500 mL :

含有 5 % 濃硫酸( $H_2SO_4$ )、5 % *p*-Anisaldehyde 及 90 % 酒精。

LB 培養液 :

每升加入 10g Bacto-Tryptone、5g yeast extract 以及 5g NaCl

BMGY 培養液 :

1 % Yeast extract、2 % Peptone，高溫高壓滅菌後再加入下述之試劑  
100 mM Potassium phosphate pH 6.0 (高壓滅菌後存放於室溫)

1.34 % Yeast nitrogen base (過濾滅菌存放於 4 °C 一年)

4×10<sup>-5</sup> % Biotin (過濾滅菌後可存放於 4 °C 一年)

1 % Glycerol (過濾滅菌後存放於室溫)

存放於 4 °C 4~6 個月

BMMY 培養液：

1 % Yeast extract、2 % Peptone，高溫高壓滅菌後再加入下述之試劑

100 mM Potassium phosphate pH 6.0 (高壓滅菌後存放於室溫)

1.34 % Yeast nitrogen base (過濾滅菌後存放於 4 °C 一年)

4×10<sup>-5</sup> % Biotin (過濾滅菌後存放於 4 °C 一年)

5 % Methanol (過濾滅菌後存放於 4°C 一年)

存放於 4 °C 4~6 個月

Low salt LB 培養液 (pH 7.0)：

1 % Tryptone、0.5 % Yeast extract、0.5 % NaCl，高壓滅菌後存放於室溫

Low salt LB 培養基：

2 % agar、1 % Tryptone、0.5 % Yeast extract、0.5 % NaCl，高壓滅菌後存放於 4 °C

MM 培養基：

2 % agar，高壓滅菌後分別加入 1.34 % Yeast nitrogen base (過濾滅菌存放於 4 °C 一年)、4×10<sup>-5</sup> % Biotin (過濾滅菌後可存放於 4 °C 一年)、0.5 % Methanol (過濾滅菌後存放於室溫)，之後將之存放於 4 °C

MD 培養基：

2 % agar，高壓滅菌後分別加入 1.34 % Yeast nitrogen base (過濾滅菌存放於 4 °C 一年)、4×10<sup>-5</sup> % Biotin (過濾滅菌後可存放於 4 °C 一年)、2 % Dextrose (過濾滅菌後存放於室溫)，之後將之存放於 4 °C



YPD 培養液：

1 % Bacto yeast extract、2 % Bacto peptone、2 % Dextrose 高壓滅菌後  
存放於 4°C

TBS 緩衝液：

50mM Tris-HCl(pH 7.5)，150mM NaCl 高溫高壓滅菌後存放於室溫

PBS 緩衝液：

1.37g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>，在加入 0.35g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 及 8.77g NaCl，加二次水至  
1L(pH 7.4)，存放於室溫



## 2-3 實驗儀器

均質機 (Brinkmann)

高速離心機 (Allegra 21 Series, Beckman)

超高速離心機 (Sorvall RC 5C)

微量旋轉式真空濃縮機 (Spin Vaccum, SAVANT)

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

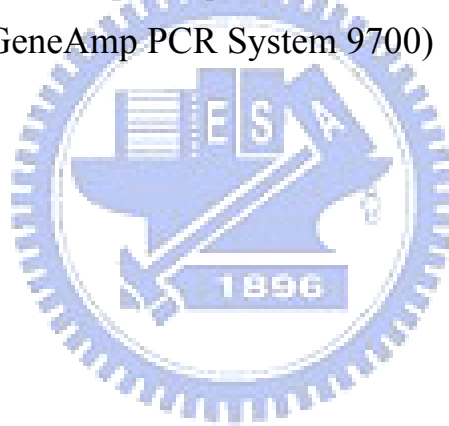
超過濾裝置 (Ultrafiltration System, Amicon)

微盤光譜分析儀 (Fusion Universal Microplate Analyzer, Packard)

高效率液相層析儀 (High Performance Liquid Chromatography, Beckman)

螢光光譜儀 (Fluorescence Spectrophotometer, Hitachi FL-4500)

PCR (Perkin Elmer, GeneAmp PCR System 9700)



## 實驗方法

### 2-4 牛肝中氧化鯊烯環化酵素的純化



【表 2-1】 牛肝中氧化鯊烯環化酵素的純化流程



### 2-4-1 溶解微粒體(Microsome)

由-80°C 冰箱中取出牛肝約 500 克，置於 4°C 冰箱中解凍並以 HB I 緩衝液清洗，將肝切成小方塊狀後，以牛肝與 HB I 為 1:2 的體積比例打碎，每攪打 30 秒鐘即冰浴冷卻 10 秒鐘，持續直到溶液中無塊狀物存在；之後在 4°C 下以轉速 10,000xg 離心 30 分鐘，取出上清液(supernatant)後將沈澱物丟棄，在 4°C 下以轉速 123,000xg 超高速離心 1 小時 30 分鐘，收集細胞微粒體(microsomal pellets)【表 2-1】。

### 2-4-2 粗萃取液(Crude Extract)

將所有細胞微粒體沈澱物溶於 100mL 的 HB II，並置於冰浴中；以均質機每分鐘 20,000 轉的轉速將微粒體沈澱打散；再加入總濃度為 0.5% Triton X-100 和 1 mM DTT，在 4°C 下以磁石攪動至少 1 小時；最後在 4°C 下以 123,000xg 超高速離心 1 小時 30 分鐘，收集上清液。

### 2-4-3 Q-Sepharose 陰離子交換管柱層析

將粗萃取液進行 BCA Assay 濃度測量，估算所含的蛋白質總量，並決定需填充於管柱中 Q-Sepharose Fast Flow 陰離子交換樹脂所需的體積。先以 4 倍樹脂體積的 IEB 來平衡管柱中的 Q-Sepharose 陰離子交換樹脂；再將粗萃取液導入，同時開始收集流出物 (Flowthrough)；以 4 倍填充樹脂體積的 IEB 將無法與樹脂結合的蛋白質先沖洗出，同時也收集流出物 (Wash)。接著分別以 20 mM、50 mM、70 mM 和 100 mM 四種不連續的氯化鉀(KCl)鹽梯度沖提，以每管 10 mL (約 800 滴) 收集。收集完畢後將每管分別取樣做酵素活性測試和蛋白質濃度測量，將具有活性且蛋白質濃度較高的部分收集起來。經由透析(Dialysis)方式除去 KCl 鹽類和進行緩衝溶液的交換 (HAB, pH 7.4)，第一次透析約 2~3 小時，第二次則放置隔夜；之後利用超過濾法(Ultrafiltration)濃縮溶液至剩餘體積約 30 mL。

## 2-4-4 Hydroxyapatite Gel 管柱層析

先以 4 倍 Hydroxyapatite Gel 填充樹脂體積的 HAB 平衡管柱。注入上述所得樣品，同時收集流出物 (Flowthrough)；再以 5 倍填充樹脂體積的 HAB 沖提，以每管 5 mL (約 400 滴) 收集。收集完後將每管取樣做酵素活性測試和蛋白質濃度測量，具有活性且蛋白質濃度較高的部分收集起來，濃縮溶液至剩餘體積約 30 mL。

## 2-4-5 HiTrap Heparin 管柱層析

先以 4 倍 HiTrap Heparin 填充樹脂體積的 HB 平衡管柱。將上述所得的樣品導入，同時收集流出物 (Flowthrough)；以 4 倍填充樹脂體積的 HB 把無法與樹脂結合的蛋白質先沖出，同時收集流出物 (Wash)。分別以 50 mM、100 mM 和 1 M 三種不連續的 KCl 鹽梯度沖提，每管收集 2 mL (約 200 滴)。收集完畢後分別取樣做酵素活性測試、蛋白質濃度測量與 SDS-PAGE 蛋白質電泳分析。

## 2-4-6 酵素的分子量及純度分析

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

### 12.5 % Separating gel

30 % acrylamide / 1 % bis-acrylamide	8 mL
1.5M Tris-buffer (pH8.8)	5 mL
20% SDS	100 $\mu$ L
dd H <sub>2</sub> O	6.8 mL
10% APS	100 $\mu$ L
TEMED	10 $\mu$ L
Total Amount	20 mL

### 5 % Stacking gel

30 % acrylamide / 1 % bis-acrylamide	1.3 mL
1M Tris-buffer (pH6.8)	1.25 mL
20% SDS	50 $\mu$ L
dd H <sub>2</sub> O	7.35 mL
10% APS	50 $\mu$ L
TEMED	10 $\mu$ L
Total Amount	10 mL

【表 2-2】 製作 12.5 % separating gel 及 5 % stacking gel 電泳膠片的配方

#### 2-4-7 酵素溶液的保存

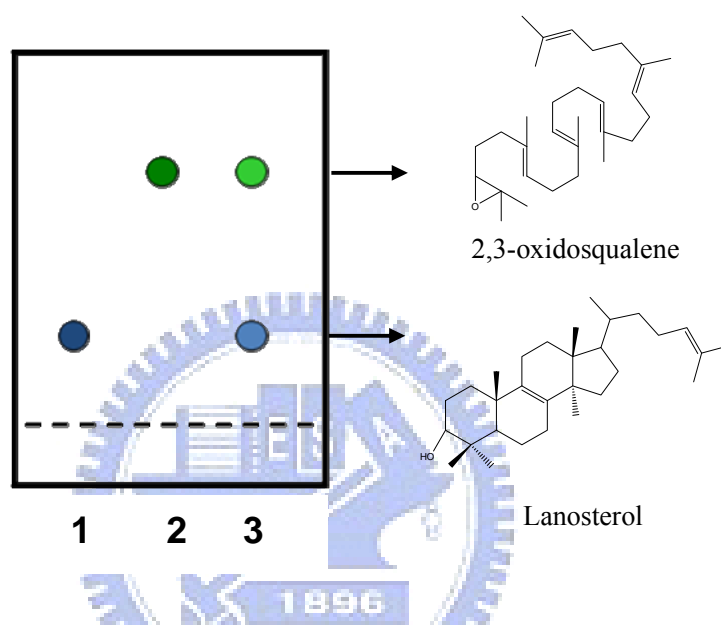
藉由 SDS-PAGE 電泳分析，可以判斷純化所得酵素的分子量大小與純度，因此將具有活性且純度高(單一蛋白質帶)的部分收集後，分裝於微量管中，並置於 -80 °C 冰箱中保存，避免酵素活性流失。

## 2-5 蛋白質濃度與酵素活性的測量

對於蛋白質濃度測定，所採用的方式是 BCA (bicinchoninic acid) Assay 技術，BCA Assay 類似於 Lowry 反應，但是以 BCA 試劑取代 Folin-Cocalteu 試劑，在鹼性環境下藉由蛋白質可使二價銅離子還原成為一價銅離子，而兩個 BCA 分子則會與一價銅離子形成錯合物，在波長 562 nm 下產生明顯的紫色，利用光譜儀的分析則能夠以吸收值的大小判斷溶液中蛋白質濃度的多寡。以商業化產品 BCA Proteins Assay Kit 進行蛋白質濃度測量，取出蛋白質溶液樣品 25  $\mu\text{L}$  於 96-well ELISA plate 之中，加入已混合均勻的 BCA 試劑 200  $\mu\text{L}$  (Reagent A / B = 50 / 1 的比例)，置於 37 $^{\circ}\text{C}$  下反應 30 分鐘，測量溶液在波長 560 nm 時的吸收值變化；同時，先配置好五個不同濃度的已知 BSA 標準溶液，可定出一線性的標準曲線(linear standard curve)，而所測得的吸收值則可用內插法的方式，換算為對應蛋白質的濃度。

氧化鯊烯環化酵素的活性測試 (OSC Activity Assay)，是由觀察產物的生成與否，以判斷酵素是否具有活性的方法。取 5  $\mu\text{L}$  10  $\mu\text{M}$  受質氧化鯊烯(OS)至微量管(eppendorf tube)中，加入 2  $\mu\text{L}$  0.5 % Triton X-100 及 200  $\mu\text{L}$  蛋白質溶液，混合均勻後置於溫度 37  $^{\circ}\text{C}$  下進行反應 (Incubation) 2 小時。之後加入 EtOH / H<sub>2</sub>O = 9 / 1 的酒精溶液 200  $\mu\text{L}$ ，劇烈振盪(Vortex) 10 秒鐘，於 70  $^{\circ}\text{C}$  下加熱 20 分鐘以中止反應；待其冷卻至室溫後，加入 400  $\mu\text{L}$  (等體積)的二氯甲烷(CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)以萃取反應物，將混合液經劇烈振盪 30 秒鐘後，離心 5 分鐘，將其水層(上層)轉移至新的微量管之後再重複進行一次萃取過程。把兩次萃取所得的有機層收集在一起，以真空濃縮機乾燥溶劑；再加入 50  $\mu\text{L}$  CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>，藉由薄層液相管柱層析(thin-layer liquid chromatography, TLC)，以毛細管把樣品點在 TLC 玻璃片上，以 EA / Hexane = 1 / 4 (20 % EA , v/v) 為比例的展開液展開，浸漬於染劑(stain solution)數秒鐘，於加熱板(hot plate)上加熱並觀察結果。

如【圖 2-1】所示，具有活性的酵素溶液經過反應後，在 TLC 片上與標準物羊毛硬脂醇(LA) 相同的位移距離( $R_f$ )，會出現一明顯的紫色色點；相對地，若不具有活性的酵素反應，則僅會有受質 OS 的綠色色點存在。



【圖 2-1】 TLC 活性測試示意圖

(1：LA 標準物，2：OSC 無活性，3：OSC 具有活性)

## 2-6 利用 *Pichia* 系統表現牛肝氧化鯊烯環化酵素

### 2-6-1 表現載體的構築

利用基因選殖的方式，依據牛肝中的氧化鯊烯環化酵素(Bovin Liver oxidosqualene cyclase, B.L-OSC)基因序列設計合成兩段引子(Primer)，所設計的限制酶切位為 *Sac* II / *Xba* I 和 *Xho* I / *Xba* I 兩組(參照附錄一)，用聚合酶連鎖反應(polymerase chain reaction, PCR)的方法以進行基因片段的增殖。取 0.5 $\mu$ L 含有牛的氧化鯊烯環化酵素基因的染色體 DNA 當做模板，加入 15 $\mu$ L 3.3X XL Buffer II、3 $\mu$ L 25mM Mg(OAc)<sub>2</sub>、4 $\mu$ L dNTP mix(含 dATP, dCTP, dGTP 及 dTTP 各 2.5 mM)、0.5 $\mu$ L rTth polymerase(2U/ $\mu$ L)、兩段引子各 1 $\mu$ L，最後以去離子水補至總體積為 50 $\mu$ L【表 2-3】。置入 PCR 反應器(96-well GeneAmp PCR System 9700 Thermal Cycler)中，PCR 反應條件為 94 $^{\circ}$ C 作用 15 秒、58 $^{\circ}$ C 作用 2 分鐘、72 $^{\circ}$ C 作用 7 分鐘共 29 個循環，最後以 72 $^{\circ}$ C 作用 30 分鐘完成最後的反應【表 2-4】。將 PCR 產物經由 agarose gel 電泳分析(將 PCR 產物加入 1 $\mu$ L Loading Buffer 及 1 $\mu$ L SYBR Green I，利用 1% 洋菜凝膠以電壓 100 伏特進行電泳分析)確定正確大小後，與 pCR 2.1-TOPO 載體進行接合，並與大腸桿菌 XL1-Blue 勝任細胞(competent cell)進行重組質體轉化作用(transformation)，最後均勻塗佈於含 100 $\mu$ g/mL 的 ampicillin 的 LB 培養基上，培養隔夜後，挑選單一菌落利用 Plasmid Miniprep Purification Kit 進行 DNA 的小量抽取，之後以限制酵素切割以確定重組菌株之正確性。



反應物	體積 (單位 $\mu\text{L}$ )
template	0.5
Primer1	1
Primer2	1
3.3X XL Buffer II	15
25mM $\text{Mg}(\text{OAc})_2$	3
dNTP mix (各 2.5mM)	4
ddH <sub>2</sub> O	24.5
rTth polymerase	1

【表 2-3】PCR 反應試劑的量

部分	循環 (次)	溫度 ( $^{\circ}\text{C}$ )	時間
1	1	94	1 : 00
2	29	94	0 : 15
		58	2 : 00
		72	7 : 00
3	1	72	30 : 00
4	1	4	pause

【表 2-4】PCR 反應條件

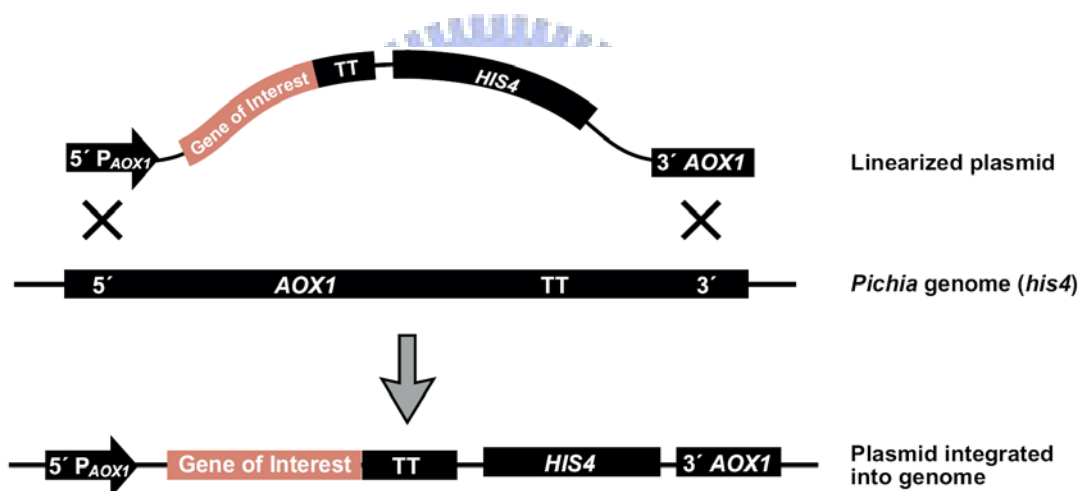
將含有牛肝中的氧化鯊烯環化酵素基因片段之重組 pCR 2.1-TOPO 質體經確認後，將牛肝中的氧化鯊烯環化酵素的基因片段切出，與酵母菌表現載體 pPICZB 或 pGAPZ $\alpha$ A 進行接合作用(利用 agarose gel 電泳分析把正確大小之載體與 DNA 序列切下，以 gel extraction kit 純化凝膠中的 DNA，並以一定比例 insert : vector = 6 : 1 混合，抽乾後以 10 $\mu\text{M}$  的二次水回溶，並加入接合酵素 T4 DNA Ligase，於 4 $^{\circ}\text{C}$  下反應隔夜)，並轉化至大腸桿菌 XL1-Blue 勝任細胞，再以含 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$  Zeocin 之低鹽 LB 培養基(low salt LB plate)進行重組

菌株的篩選。將各株重組質體 DNA 經小量抽取後，以限制酵素切割作用分析，確認接入基因具有正確的方向性，並且再進一步以核酸定序分析確認基因序列的正確性。在完成 pPICZB/B.L-OSC(*Sac* II / *Xba* I)和 pGAPZαA/B.L-OSC(*Xho* I / *Xba* I)重組表現載體的構築後，以低鹽 LB 培養液(low salt LB medium)培養重組之大腸桿菌菌株，並以小量抽取並純化質體 DNA 以提供進行酵母菌之電孔轉化作用(electroporation)。

## 2-6-2 酵母菌之轉化作用

取 2 $\mu$ L 質體重組 DNA 先以限制酶酵素 *Pme* I 將 DNA 切成直鏈 (Linear)狀，經由 agarose gel 電泳分析，再利用 gel extraction kit 純化 DNA，保存於-20 $^{\circ}$ C 中。並且取單一菌落的 *P. pastoris*(GS115 或 X33) 在 30 $^{\circ}$ C 下培養於 3mL YPD 培養液中震盪培養至隔夜，取 0.5mL 菌液至 100mL YPD 培養液中，30 $^{\circ}$ C 下培養至 OD<sub>600</sub> 值為 1.3~2 之間，於 4 $^{\circ}$ C 下以 1,500xg 離心 5 分鐘，使菌塊與上清液分離，棄上清液並以冰的 100mL 無菌水回溶菌塊，再於 4 $^{\circ}$ C 下以 1,500xg 離心 5 分鐘，重複此步驟兩次，最後用冰的 100mL 的無菌 1M Sorbitol 回溶菌塊，並再於 4 $^{\circ}$ C 下以 1,500xg 離心 5 分鐘，棄上清液，之後以冰的 4mL 的無菌 1M Sorbitol 懸浮菌塊製備成酵母菌電孔勝任細胞。取已經切成直鏈形的質體重組 DNA 2 $\mu$ L 與 50 $\mu$ L 的酵母菌電孔勝任細胞混合置於冰上 5 分鐘，之後加入於冰浴過的電孔試管(Bio-Rad Gene Pulser cuvette, 2mm)中，將電孔試管放入脈衝控制器(Bio-Rad Gene Pulser)設定以電壓 1.7kV、電容 25 $\mu$ F 和電阻 200 ohms。以此反應條件進行電擊一次以完成電孔轉化作用，之後立即加入 1mL 之冰的無菌 1M Sorbitol 於電孔試管中將細胞混合均勻，後將內容物置於無菌的 1.5mL 離心管中，於 30 $^{\circ}$ C 靜置培養 2 個小時後，取 50 $\mu$ L 及 200 $\mu$ L 之菌液塗佈於含 100 $\mu$ g/mL Zeocin 之 YPD 培養基上，於 30 $^{\circ}$ C 下約培養 5 天至菌落出現。

將直鏈形的質體重組 DNA 送入 *P. pastoris*(GS115 或 X33)中，會在 *P. pastoris* 內進行 DNA 重組(DNA recombination)【圖 2-2】，而重組的過程中有可能會造成 AOX1 的基因發生缺陷，使其甲醇代謝能力下降，在有甲醇的條件下生長會比較緩慢，這種表現型稱 Mut<sup>s</sup>，而 AOX1 基因沒有被破壞時，此表現型為 Mut<sup>+</sup>。因此可將菌株劃於 MM(minimal methanol)及 MD(minimal dextrose)培養基上進行甲醇利用能力的分析來進一步的篩檢。另外，將電孔重組酵母菌株之單一菌落分別劃於不同濃度的 Zeocin 之 YPD 培養基上可以對其做抗藥性的分析。同時利用將電孔重組酵母菌株做 PCR 分析，確認目標基因是否有接入酵母菌 DNA 中，直接沾取單一菌落由以下條件分析【表 2-5】。



【圖 2-2】直鏈型質體 DNA 與酵母菌 genome 的重組作用

	Minimal Methanol(MM)	Minimal Dextrose(MD)
Mut <sup>+</sup>	+	+
Mut <sup>s</sup>	-	+

【表 2-5】甲基利用表現形態的篩選(+代表菌落會生長；-代表菌落不會生長。當菌落在 MM 和 MD 培養基盤中都可以生長代表表現型為 Mut<sup>+</sup>；當菌落只會生長在 MD 培養基盤中代表表現型為 Mut<sup>s</sup>。)

反應物	體積 (單位 $\mu\text{L}$ )
5' AOX I primer	1
3' AOX I primer	1
10 X buffer	2
dNTP (10mM)	2
ddwater	13.5
Taq polymerase	0.5

【表 2-6】Taq polymerase PCR 反應試劑用量

### 2-6-3 重組酵母菌之表現

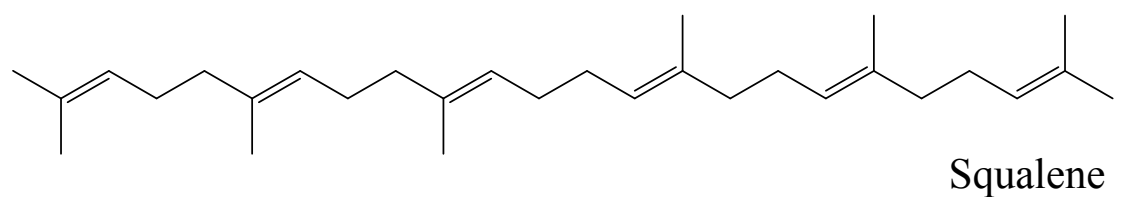
*Pichia* 真核表現載體 pPICZB 因含有 AOX1(alcohol oxidase) promoter 和終止序列 (5'AOX1 和 3'AOX1 TT) , 需經甲醇誘導進行表現; 而表現載體 pGAPZ $\alpha$ A 則以 GAP (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) promoter 來取代 AOX1 promoter , 並不需經誘導而能持續表現。挑取酵母菌 pPICZCB 重組轉殖株單一菌落並接種於裝有 50 ml BMGY 培養液之 500ml 錐形瓶, 於 30°C 震盪培養至 OD<sub>600</sub> 值為 2~6 後, 以 1,500 X g 離心 5 分鐘去除 BMGY 培養液, 重新將菌塊懸浮於 BMMY 培養液並於 30°C 震盪進行誘導培養。每 24 小時以 100%之 methanol 將培養液調整成 1%之 methanol 濃度, 直至 72 小時為止。而酵母菌 pGAPZ $\alpha$ A 重組轉殖株則依上述相同方式培養於 50 ml YPD 培養液中且不添加 methanol 進行表現。接著以 1,500 X g 離心 5 分鐘, 分別收取上清液跟沉澱物進行 SDS-PAGE 分析和活性分析, 並利用表現之蛋白質在其 C 端會接上六個 Histidine 的特性, 以 nickel 層析管柱來分離純化。

## 2-7 受質 2,3-氧化鯊烯的合成

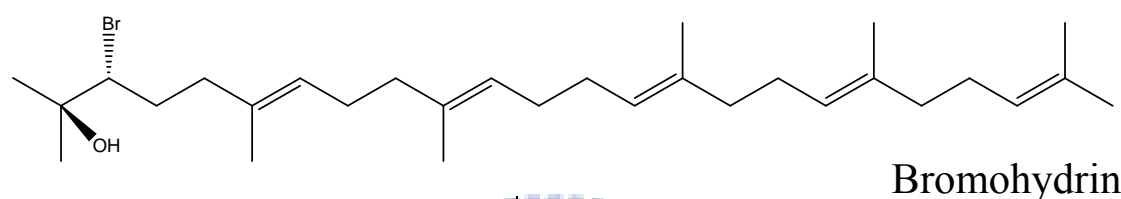
將 10mL squalene(20.94 mmole)溶於裝有 160mL THF 的三頸瓶之中，並且冰浴在溫度 0°C 中，在磁石攪拌下緩緩加入二次水(約 40 mL)，直到溶液呈現白色混濁狀；將 3.75g 的 NBS(N-Bromosuccinimide, 21.50 mmole)先溶於 50 mL THF 中，再以加料管緩慢注入反應瓶中，此步驟必須盡量在避光下反應 2~3 小時，後以 400mL 和兩次的 150 mL Hexane 萃取，收集有機層(上層)，加入 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 除水，抽氣過濾後濃縮至乾，以 100mL Hexane 回溶，重複一次上述的萃取過程，則可得到淡黃色油狀的混合產物。

接著以 silica gel 填充管柱，進行化學管柱層析分離，分別以 0%、2%、5%、10% EA / Hexane 等四種不同極性梯度的沖提液沖提，並藉由 TLC 分析方法作為判斷，收集所需部分後濃縮抽乾，則可以得到中間產物 Bromohydrin。

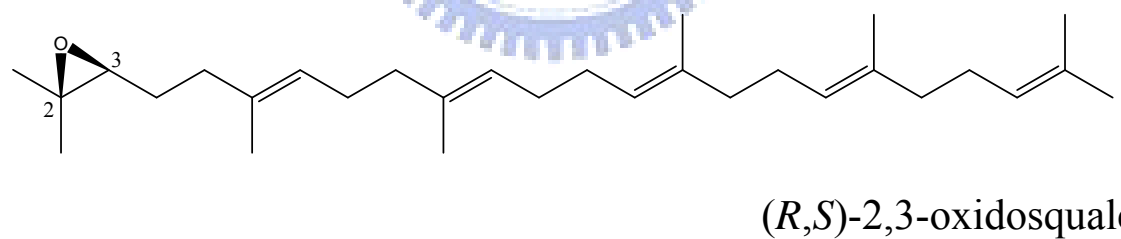
將中間產物 Bromohydrin 溶於含有 100 mL 甲醇的三頸瓶中，並置於 4°C 冰箱內，加入 345mg K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2.50 mmole)，以磁石攪拌反應須超過 15 個小時，反應完成後，以 4 次 200mL Hexane 和 1 次 150mL 二次水萃取，收集有機層(上層)，加入 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 除水，抽氣過濾後濃縮抽乾，可以得到最終產物氧化鯊烯(*R,S*)-2,3-oxidosqualene【圖 2-3】。



1. H<sub>2</sub>O  
2. NBS / THF



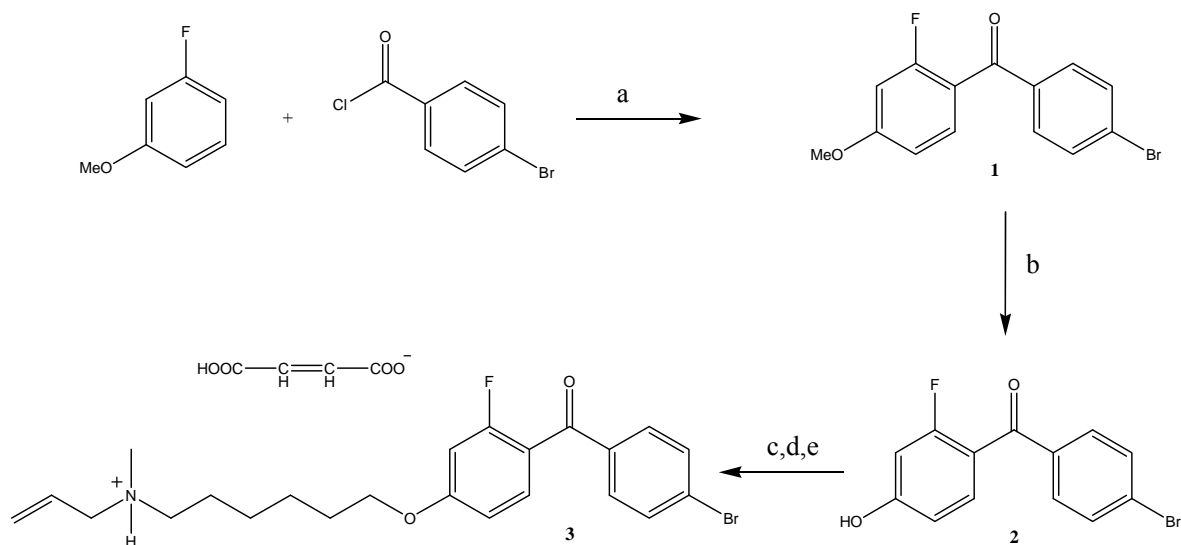
K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> / CH<sub>3</sub>OH



【圖 2-3】受質 2,3-氧化鯊烯的合成途徑



## 2-8 氧化鯊烯環化酵素抑制物 Ro 48-8071 的合成



【圖 2-4】氧化鯊烯環化酵素抑制物 Ro 48-8071 的合成途徑<sup>27</sup>

(a) Nitrobenzene/ $\text{AlCl}_3$ , (b)  $\text{HBr}/\text{CH}_3\text{COOH}$ , (c) 1,6-dibromohexane/ $\text{K}_2\text{CO}_3$  in acetone, (d) N-allylmethylamine in N,N-dimethylacetamide, (e) fumaric acid in ethanol.

### 合成(4-Bromo-phenyl)-(2'-fluoro-4'-methoxy-phenyl)-methanone [I]

取 100 mL 硝基苯置於三頸瓶中，在冰浴底下，加入 30g (0.22 mol) 的氯化鋁 (Aluminum chloride,  $\text{AlCl}_3$ )，維持溶液在  $0^\circ\text{C}$ ，同時取 44g (0.2mol) 4-溴苯甲基醯氯 (4-bromobenzoyl chloride) 溶於 40mL 的硝基苯中，緩慢加入反應瓶中，反應須超過二十分鐘。之後再加入 23mL (0.2 mol) 的 3-氟苯甲基醚 (3-fluoroanisole)，於室溫下反應隔夜；加入 100mL 冰水中止反應，以 3 次 100mL  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  萃取，再以 2 次 100mL 二次水連續清洗三種有機溶劑，以  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  除水，收集有機層後，進行高溫蒸餾過程 ( $150\sim 180^\circ\text{C}$ )，產生 (4-bromo-phenyl)-(2'-fluoro-4'-methoxy-phenyl)-methanone 和 (4-bromo-phenyl)-(4'-fluoro-2'-methoxy-phenyl)-methanone 兩者的混合物，迅速加入 60mL 乙酸乙酯

(ethyl acetate, EA) 使其溶解，在室溫下進行結晶(Crystalization)過程，將所得結晶固體抽氣過濾，並以 100mL EA 及 3 次 100mL 環己烷(cyclohexane)沖洗，即可得到精純的中間產物 (4-bromo-phenyl)-(2'-fluoro-4'-methoxy-phenyl)-methanone[1]。

### 合成(4-bromo-phenyl) - ( 2'-flouro-4'-hydroxy-phenyl )-methanone

[2]

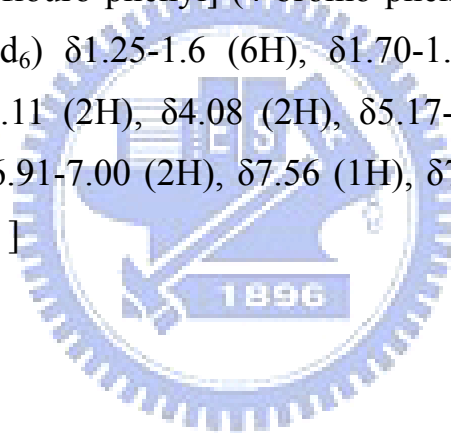
取上述中間產物[1] 12.4g (40 mmol) 溶於 80mL 醋酸中，加入 60 ml 48%-氫溴酸(hydrobromic acid, HBr)，在溫度 125°C 下以磁石攪拌 8 小時，反應完全後以高溫蒸餾去除溶劑(100°C)，將殘餘固體溶於 100 mL EA，以 60 mL 飽和碳酸氫鈉溶液(saturated NaHCO<sub>3</sub>)及 60mL 10%-氯化鈉溶液清洗。取水層部分再用 2 次 100mL EA 萃取，合併所有的有機相溶劑，以 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 除水，再濃縮至乾，則可得到橘黃色的中間產物 (4-bromo-phenyl)-(2'-flouro-4'-hydroxy-phenyl)-methanone [2]。

### 合成[4'-( 6-allyl-methyl-amino-hexyloxy)-2'-fluoro-phenyl]-

### 4-bromo-phenyl)-methanone [3]

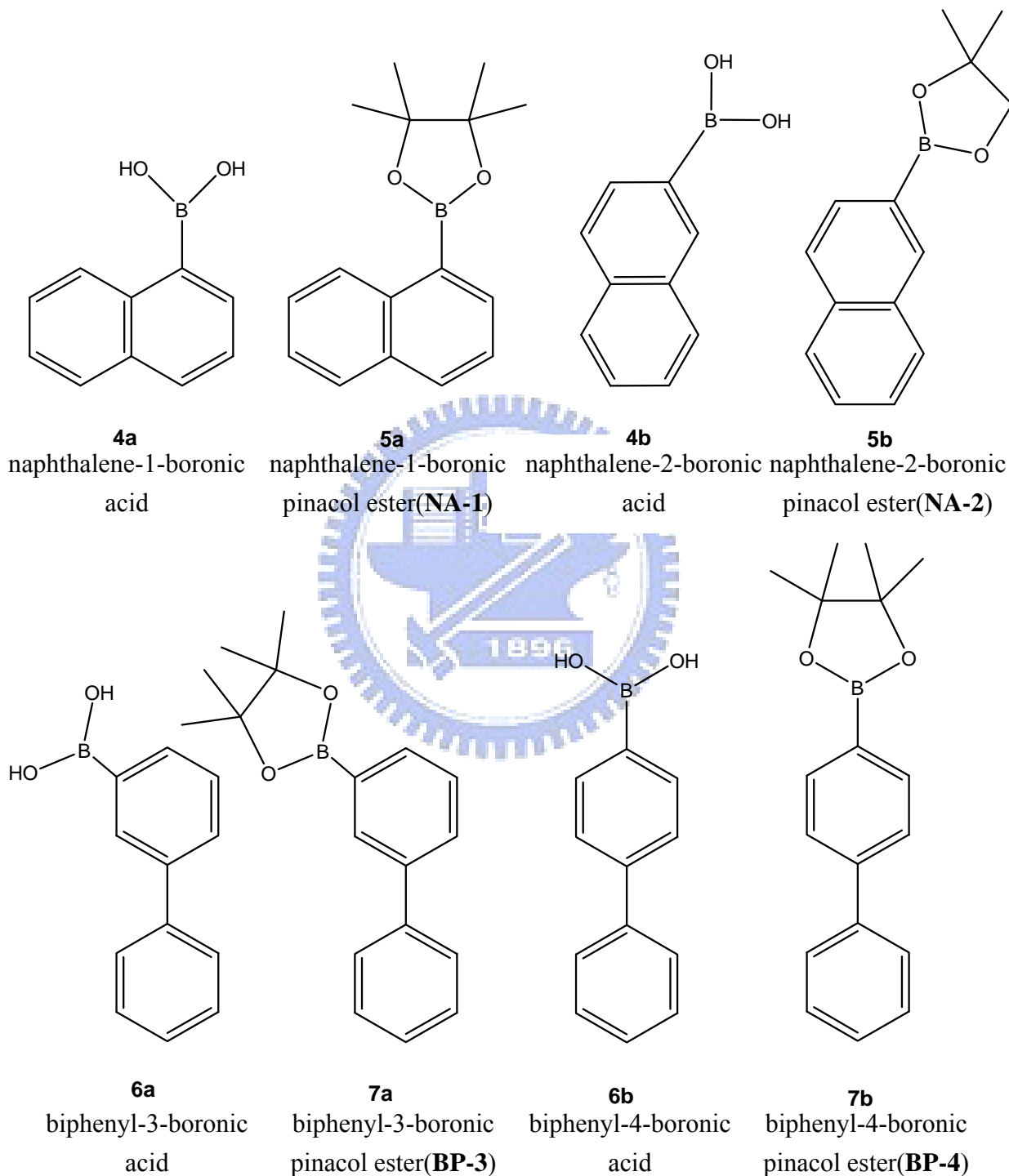
取 7g (24 mmol) 的中間產物[2]，溶於 11mL (72 mmol) 1,6-二溴己烷(1,6-dibromohexane)，將 10g (72 mmol)碳酸鉀(potassium carbonate, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) 溶於 220 ml 丙酮中，緩慢加入至裝有 1,6-二溴己烷的三頸瓶中，在 75°C 下劇烈攪拌 5 小時，抽氣過濾並濃縮抽乾後，先以少量 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 回溶，再以 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 除水，經過再次過濾及濃縮抽乾後，加入 80 mL Cyclohexane / Hexane = 1 / 3 (v/v) 的混合液，先置於 0°C 下，再改置於 -80°C 下進行再結晶過程，可以得到 10g (22 mmol) 的晶體產物 [4'-(6-bromo-hexyloxy)-2'-flouro-phenyl]-(4-bromo-phenyl)-

methanone。逐滴加入 80mL *N,N*-二甲基乙醯胺(*N,N*-dimethylacetamide) 溶解此結晶產物，冷卻至 0°C 下，緩慢滴入 4.3mL (44 mmol) *N*-丙烯基甲基胺(*N*-allylmethylamine)，室溫下反應 22 ~ 24 小時後，再次冷卻至 0 °C，及滴入 4.3 mL *N*-allylmethylamine 後，反應 5 小時，以高溫蒸餾(70°C, 1 Torr)方法去除雜質，再用 60mL 飽和 NaHCO<sub>3</sub> 溶液中中和殘留物，並以 3 次 80mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 萃取，收集有機層，以 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 除水，濃縮抽乾，以 silica gel 填充，利用管柱層析法進行純化分離，以 500 mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> / MeOH = 95 / 5 (v/v) 的比例作為沖提液沖提，經由 TLC 判斷，收集所要的部分後濃縮抽乾。將 2 g (17.2mmol) 反-丁烯二酸(fumaric acid)先溶於 40mL 絕對酒精中，緩慢滴入瓶中進行反應，濃縮抽乾後，可得到最終產物 Ro48-8071： [4'-(6-allyl-methyl-amino-hexyloxy)-2'-fluoro-phenyl]-(4-bromo-phenyl)-methanone<sup>27</sup>。 [ <sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ1.25-1.6 (6H), δ1.70-1.80 (2H), δ2.24 (3H), δ2.40-2.50 (2H), δ3.11 (2H), δ4.08 (2H), δ5.17-5.27 (2H), δ5.75-5.90 (1H), δ6.67 (2H), δ6.91-7.00 (2H), δ7.56 (1H), δ7.65-7.76 (4H); EI-MS *m/z* 448 (M<sup>+</sup>, 1Br) 。 ]

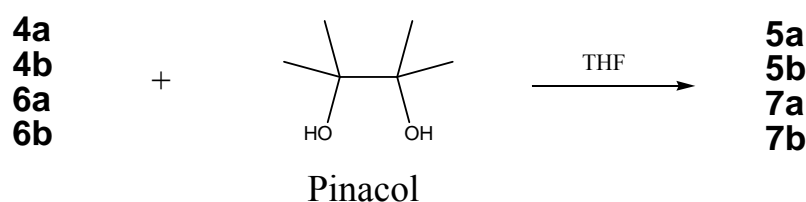


## 2-9 新型螢光抑制物的合成

### 2-9-1 含有硼酸基團螢光探針的硼酸酯化反應



【圖 2-5】螢光化合物及硼酸酯化後的螢光化合物



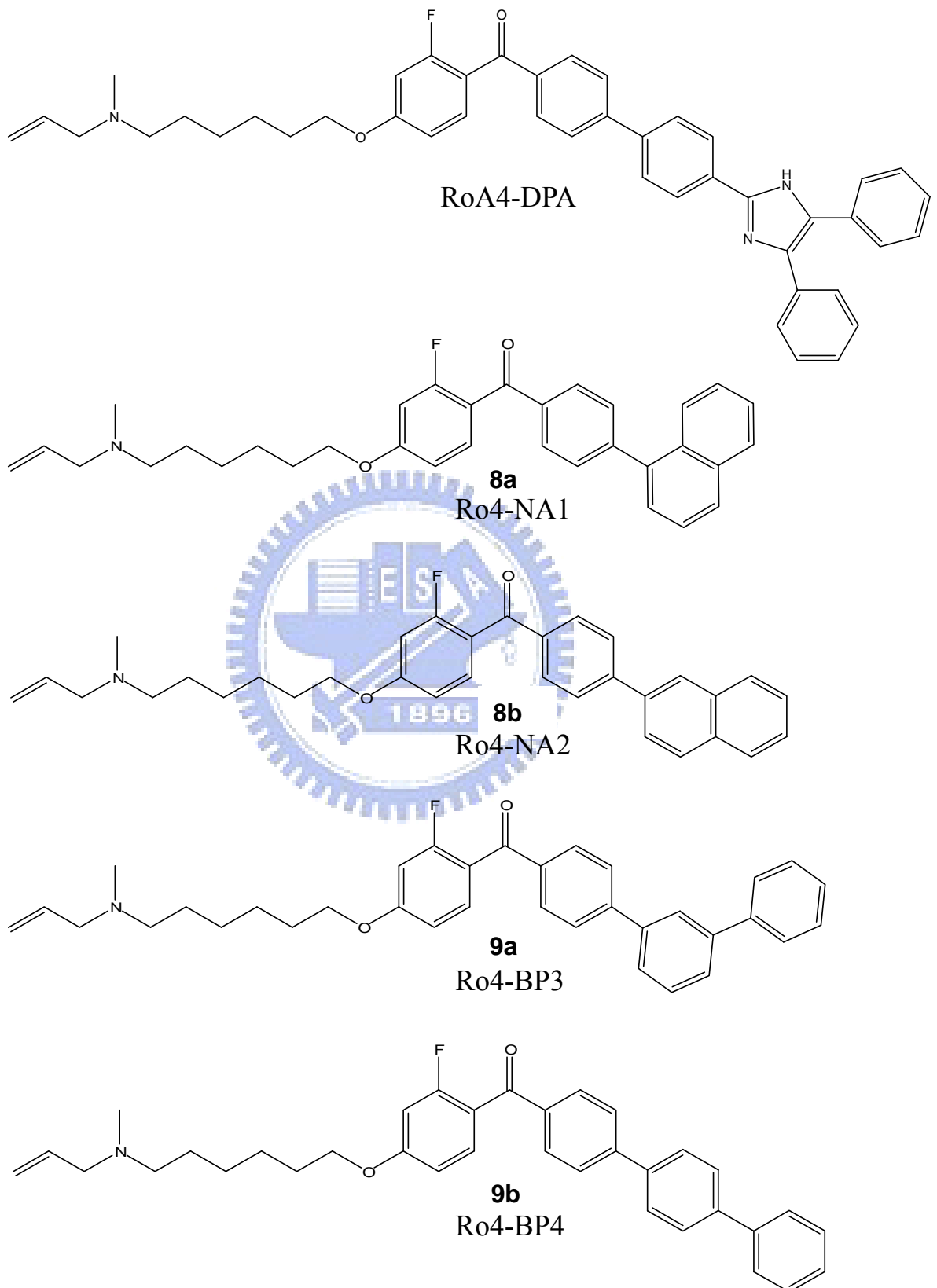
【圖 2-6】具硼酸基的螢光化合物其硼酸酯化反應流程

不管是在空氣中還是在一般常用的有機溶劑中，所有的硼酸片吶酯類(boronic pinacol esters)相較於僅含有硼酸基團的化合物有較高的穩定度。此一特性使其在反應上更有利於增進反應的產率以及純度。因此，本實驗選擇使用具有硼酸片吶酯基的螢光探針做為接下來 Suzuki 偶合反應的起始材料。

#### 合成化合物 5a (naphthalene-1-boronic pinacol ester)

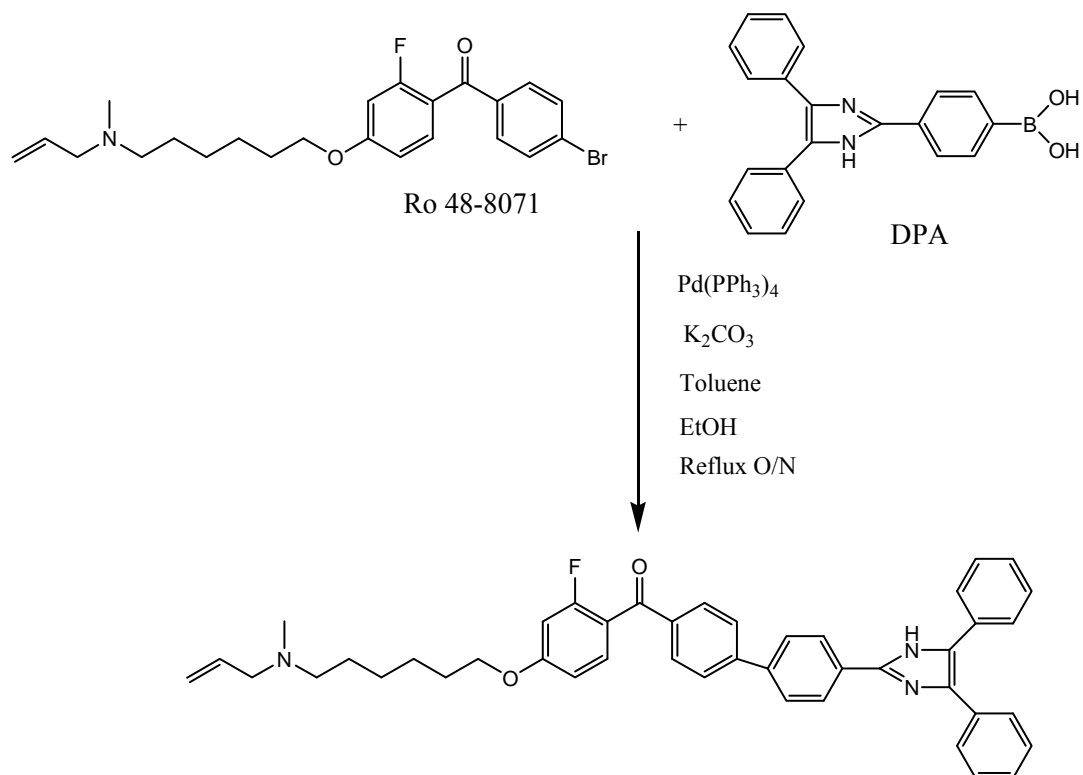
將三頸瓶架設冷凝裝置，並在冷凝管上加裝氮氣球，使反應盡量在無氧無水的環境下反應，取 1.72g (10 mmol) 的萘-1-硼酸 (naphthalene-1-boronic acid) 4a 和 1.416 g (12 mmol) 的片吶醇(pinacol) 溶解於 50 mL 的四氫呋喃(tetrahydrofuran, THF) 中，在迴流系統下反應溫度保持 70 °C，並攪拌反應至隔夜。利用 TLC 的分析來判斷反應是否反應完全；反應完後將溶劑濃縮抽乾，以 silica gel 填充，利用管柱層析法進行純化分離，使用 0% 到 10% 的 EA / Hexane=0 / 100 到 10 / 90 (v/v) 做梯度沖提，經由 TLC 判斷，收集所要的部分後濃縮至乾。即可得到產物萘-1-硼酸片吶醇酯(naphthalene-1-boronic pinacol ester) 5a。化合物 5b，7a 和 7b 合成步驟如同 5a。

## 2-9-2 螢光探針與抑制物 Ro 48-8071 的結合



【圖 2-7】合成之螢光物標定 Ro48-4071

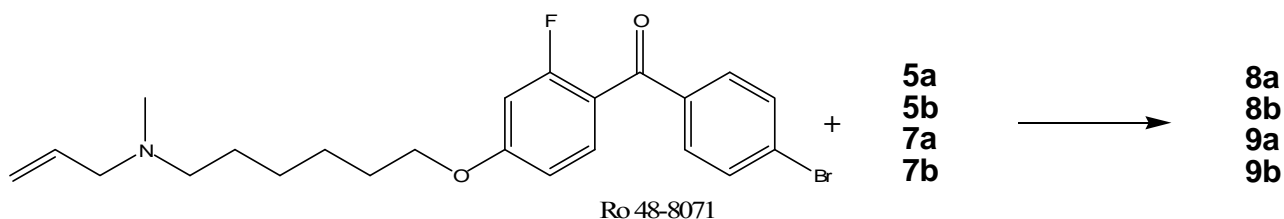




【圖 2-8】利用 Suzuki coupling 反應合成 Ro4-DPA

### 合成化合物 Ro4-DPA

將三頸瓶架設冷凝裝置，並在冷凝管上加裝氮氣球，使反應盡量在無氧無水的環境下反應，取 449 mg (1 mmol) 的 Ro 48-8071 和 340 mg (1 mmol) 的 4-(4,5-diphenyl-1H-imidazol-2-yl)phenylboronic acid (DPA) 溶於 toluene / ethanol = 2 / 1 (v/v) 總共 90 mL 的混和溶液中，加入 0.28g (1 mmol) 的碳酸鉀 (potassium carbonate, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) 攪拌均勻，並利用氮氣球進行除氣的動作，再加入催化劑 Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>，在迴流系統下反應溫度保持 110°C，並攪拌反應至隔夜。利用 TLC 的分析來判斷反應是否完全，接著用三次 100mL EA 萃取，收取有機層，將溶劑濃縮抽乾，以 silica gel 填充，利用管柱層析法進行純化分離，首先用 0% 到 100% 的 EA/Hexane，接著用 0% 到 20% methanol/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 的沖提梯度來進行沖提，經由 TLC 分析判斷，收集所要的部分後濃縮抽乾。即可得到產物 Ro4-DPA。[由 <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 光譜中 δ7.00-8.14 (19H) 與 Ro48-8071 的 <sup>1</sup>H NMR 光譜相比較多了 14 個芳香族上的氫，正好和接上 DPA 所會增加氫之數目相同；在 EI-MS 的分析中其 m/z 為 664 (M<sup>+</sup>) 和 Ro48-8071 比較有相對應的增加。EI-MS 與 NMR 的分析圖譜請參見附錄二。]

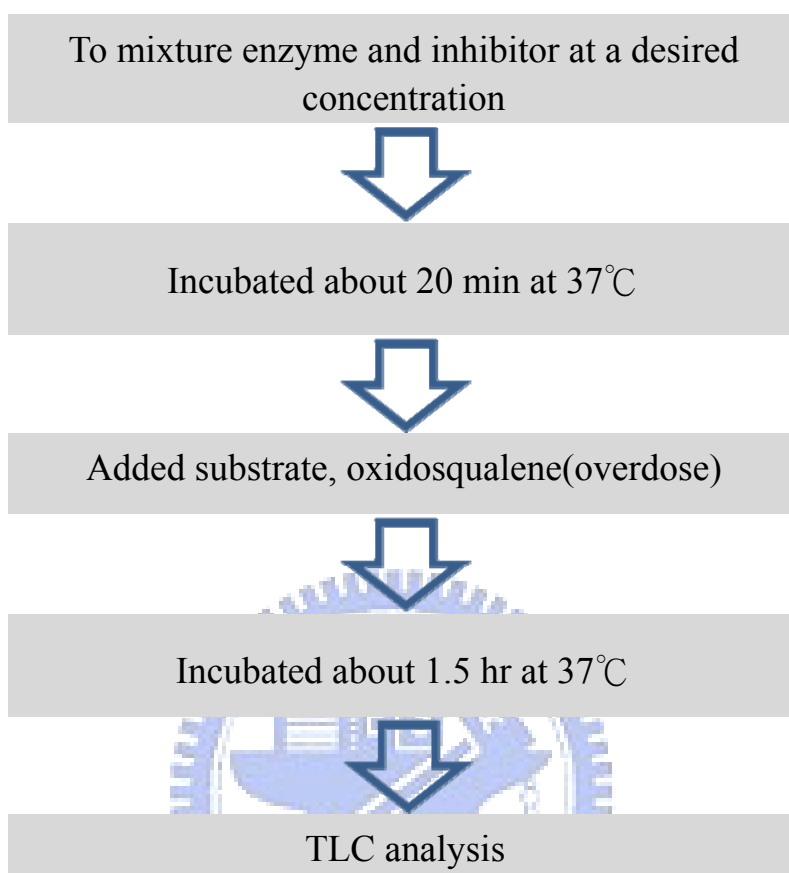


【圖 2-9】利用 Suzuki 偶合反應合成具螢光標定的 Ro48-8071

### 合成化合物 8a (Ro4-NA1)

將三頸瓶架設冷凝裝置，並在冷凝管上加裝氮氣球，始反應盡量在無氧無水的環境下反應，取 449 mg (1 mmol) 的 Ro 48-8071 和 254 mg (1 mmol) 的 5a 溶於 toluene / ethanol = 2 / 1 (v/v) 總共 90 mL 的混和溶液中，加入 0.28 g (1 mmol) 的碳酸鉀 (potassium carbonate,  $K_2CO_3$ ) 攪拌均勻，並利用氮氣球進行除氣的動作，再加入催化劑  $Pd(PPh_3)_4$ ，在迴流系統下反應溫度保持  $110^\circ C$ ，並攪拌反應至隔夜。利用 TLC 的分析來判斷反應是否完全，接著用三次 100 mL EA 萃取，收取有機層，將溶劑濃縮抽乾，以 silica gel 填充，利用管柱層析法進行純化分離，首先用 0% 到 100% 的 EA/Hexane，接著用 0% 到 20% methanol/ $CH_2Cl_2$  的沖提梯度來進行沖提，經由 TLC 分析判斷，收集所要的部分後濃縮抽乾。即可得到產物 Ro4-NA1(8a)。化合物 8b, 9a 和 9b 合成步驟如同 8a。[8a 和 8b 在  $^1H$  NMR (600 MHz,  $CDCl_3$ ) 光譜中  $\delta 7.30-8.10$  (12H) 與 Ro48-8071 的  $^1H$  NMR 光譜相比較多了 7 個芳香族上的氫，正好和修飾後所會增加氫之數目相同；在 EI-MS 的分析中其  $m/z$  為 495 ( $M^+$ ) 和 Ro48-8071 比較有相對應的增加。另外，9a 和 9b 在  $^1H$  NMR (600 MHz,  $CDCl_3$ ) 光譜中  $\delta 7.30-8.00$  (14H) 與 Ro48-8071 的  $^1H$  NMR 光譜相比較多了 9 個芳香族上的氫，正好和修飾後所會增加氫之數目相同；在 EI-MS 的分析中其  $m/z$  為 521 ( $M^+$ ) 和 Ro48-8071 比較有相對應的增加。EI-MASS 與 NMR 的分析圖譜請參見附錄三。]

## 2-10 新型螢光抑制物對於氧化鯊烯環化酵素的抑制



【表 2-7】抑制劑與氧化鯊烯環化酵素抑制作用的流程圖

先將所合成的新型抑制劑以 DMSO 當溶劑各自分別配製成濃度 10 mM 保存，再利用 DMSO 稀釋成 100 $\mu$ M、10 $\mu$ M、1 $\mu$ M、0.01 $\mu$ M、0.001 $\mu$ M 等五種不同濃度的抑制物與 100 $\mu$ L(約 0.05mg)的氧化鯊烯環化酵素的混合溶液進行抑制活性的實驗。首先，將不同濃度之抑制物分別與酵素在 37 $^{\circ}$ C 下作用 20 分鐘，接著再加入過量的受質與抑制劑競爭酵素，在 37 $^{\circ}$ C 下作用 120 分鐘，接著再進行如同 2-5 節所進行的活性分析中產物萃取與 TLC 分析的步驟。進而得知抑制物的抑制效果。

## 第三章 結果與討論

### 3-1 氧化鯊烯環化酵素的純化

在本實驗中，以界面活性劑溶解酵素後，藉由三種不同性質的蛋白質管柱進行分離，以達到純化酵素的結果。每次以約 500 克重量的牛肝，根據已建立的酵素純化流程【表 2-1】進行純化。

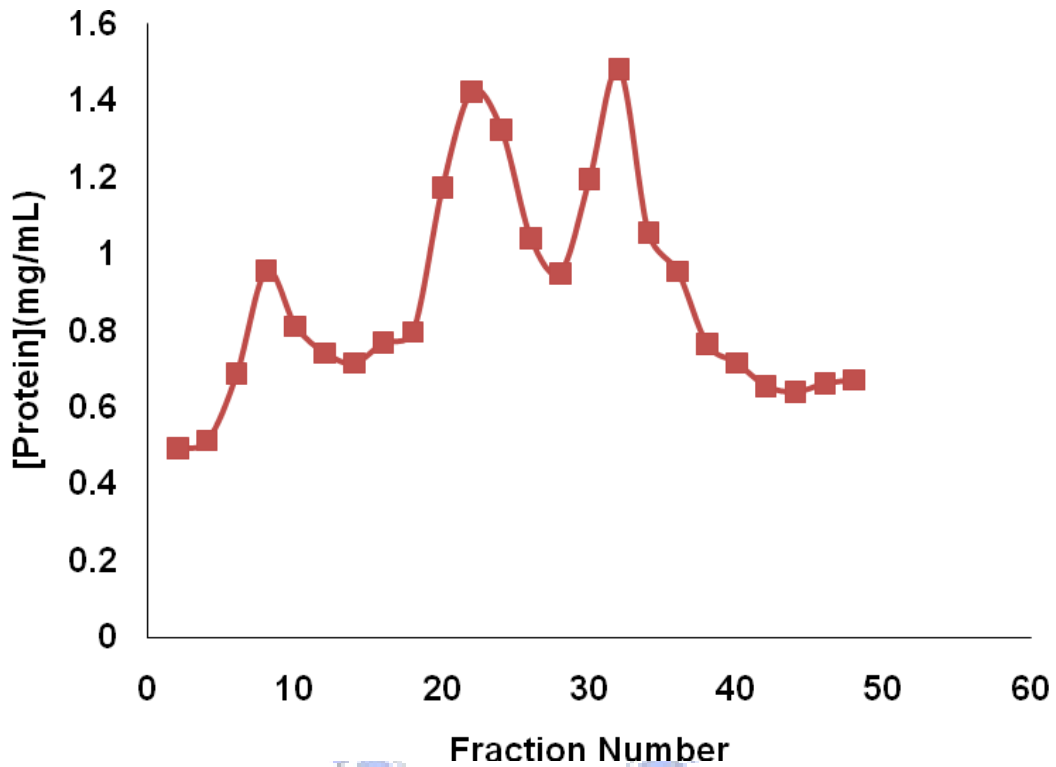
#### 3-1-1 酵素的溶解與粗萃取液

取新鮮牛肝約 500 克，以緩衝溶液溶解並且攪碎後，維持純化的過程均在 0~4 °C 的溫度下進行。高速離心主要是將多餘的雜質與組織去除掉；接著藉由超高速離心，可收集到細胞微粒體，以均質機將微粒體沈澱打散再使其溶解；加入界面活性劑 Triton X-100，由於界面活性劑是一種類似於脂質結構的雙性(amphiphilic)化合物，具有能與膜蛋白質結合的特性而可形成連接的複合物(detergent-protein complexes)，能夠使得膜蛋白質易於溶在水溶液環境中，是膜蛋白質純化過程中相當重要的步驟；利用 0.5 % Triton X-100 所溶解出的蛋白質溶液，在超高速離心後可去除細胞的懸浮物，而得到澄清的黃色粗萃取液；經過這些適當的前處理過程，將繼續進行管柱層析的純化。

#### 3-1-2 管柱層析的純化分析

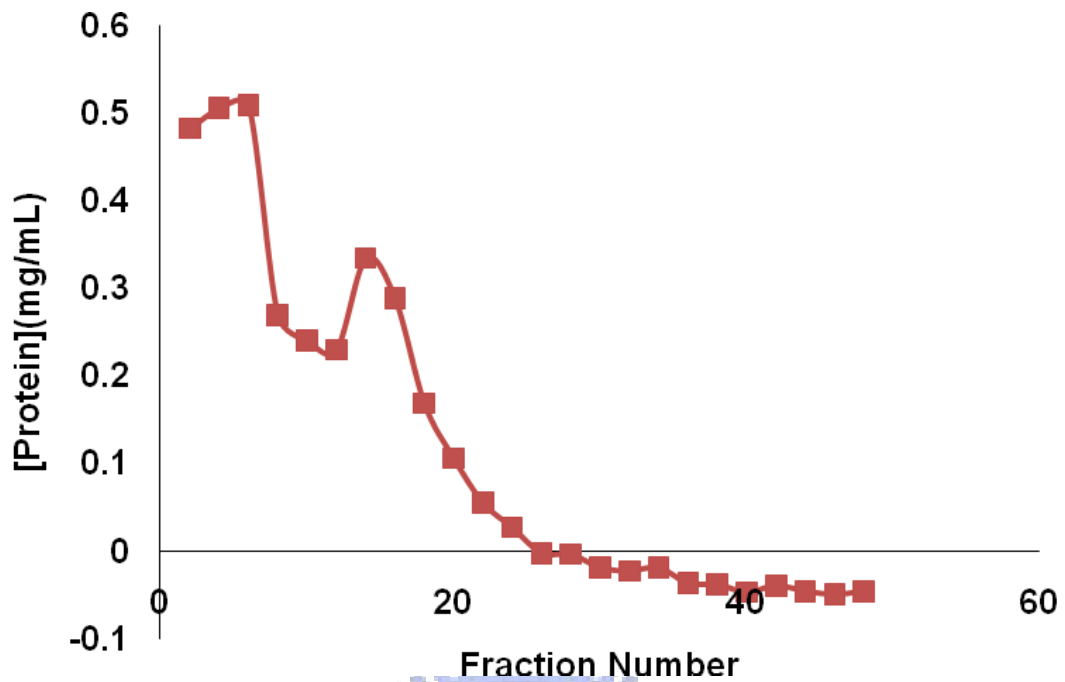
牛肝中氧化鯊烯環化酵素的純化過程中，共選擇三種不同性質的蛋白質管柱：Q-Sepharose Fast Flow 陰離子交換樹脂、Hydroxyapatite Gel、HiTrap Heparin，以進行酵素純化過程<sup>32, 35, 76</sup>。將所得的蛋白質粗萃取液首先進行 Q-Sepharose Fast Flow 強陰離子交換樹脂管柱層析，利用 20 mM、50 mM、70 mM 和 100 mM KCl 四種不連續的鹽濃度沖提分離，利用 BCA 蛋白質濃度測量分析後，由【圖 3-1】的沖提結果可觀察得到蛋白質濃度在 16~28 管有明顯的吸收峰，是在鹽濃

度為 50 ~ 70 mM 的範圍內可以被沖提出，根據酵素的活性測試，更能精確的判斷真正具有酵素活性的部分；最後，以透析方法去除溶液中多餘的鹽離子，並使用超過濾裝置濃縮蛋白質溶液。



【圖 3-1】Q-Sepharose 陰離子交換樹脂的管柱層析結果

將上述的蛋白質溶液進行 Hydroxyapatite Gel 管柱層析，以 5 mM KPi buffer (pH = 7.4) 沖提，由【圖 3-2】的結果觀察得到蛋白質濃度在 10 ~ 20 管中有明顯的吸收峰，推斷蛋白質會在此區域沖提出；但是經過酵素的活性測試後，卻發現一直到將近 50 管都仍然含有酵素活性，因此將全部具有活性，即 10 ~ 50 管的部分都收集起來，並以超過濾裝置濃縮蛋白質溶液。



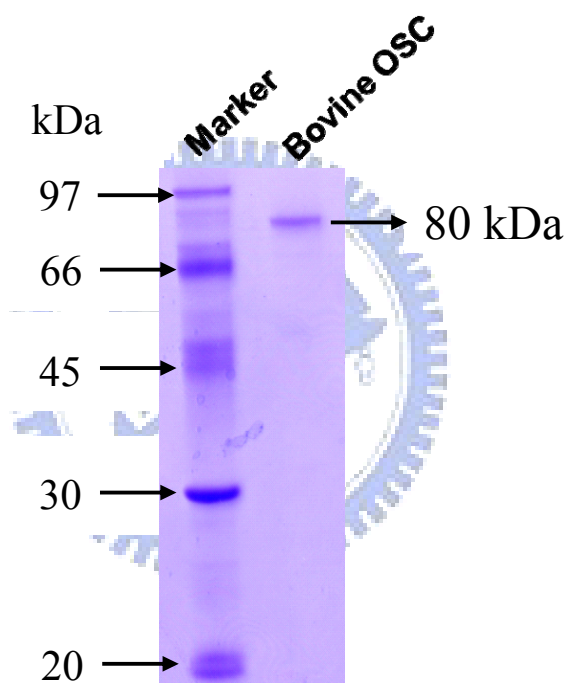
【圖 3-2】Hydroxyapatite Gel 的管柱層析結果

將上述濃縮後的蛋白質溶液繼續進行 HiTrap Heparin 管柱層析，以含有 50 mM、100 mM 和 1 M KCl 三種不連續鹽濃度的 5 mM Kpi buffer 進行沖提分離，藉由酵素的活性測試後，確定酵素活性主要只集中分佈在 5 ~ 16 管，在鹽濃度為 50 mM 的範圍之內即可沖提出；最後，將含有活性的各管分別進行 SDS-PAGE 電泳分析。



### 3-1-3 酵素分子量判定

收集具有氧化鯊烯環化酵素活性部分的蛋白質溶液，配置 12.5 % polyacrylamide gel 膠片後，以 SDS-PAGE 蛋白質電泳分析；利用 coomassie blue 染劑染色後的結果【圖 3-3】，在圖形左邊是低分子量的標準物，右邊則是在分子量約 80 kDa 的位置顯現出一主要的蛋白質帶，吻合一般哺乳類動物中的氧化鯊烯環化酵素分子量大小 (70 ~ 80 kDa)，而且酵素純度可高達 95 % 以上。



【圖 3-3】牛肝中氧化鯊烯環化酵素純化的 SDS-PAGE 結果

### 3-2 利用 *Pichia* 表現系統表現牛的氧化鯊烯環化酵素

雖然經由牛肝中純化氧化鯊烯環化酵素的方法，可以有效的從牛肝無數的蛋白質中分離純化出來，但是由於步驟繁瑣且得到的氧化鯊烯環化酵素量也不多，而且在不同批的牛肝所純化出來氧化鯊烯環化酵素產率以及純度上也非常不穩定，推測可能由於牛的個別差異性以及所在的地域性，會影響牛肝中氧化鯊烯環化酵素所含的量。並且經由文獻發現，Armin Ruf 等人已經成功的利用 *Pichia* 表現系統將具有活性的人類氧化鯊烯環化酵素表現純化出來<sup>77</sup>。因此我們為了想要能較穩定且可以取得較大量的氧化鯊烯環化酵素，也進一步對此種表現系統做了嘗試。

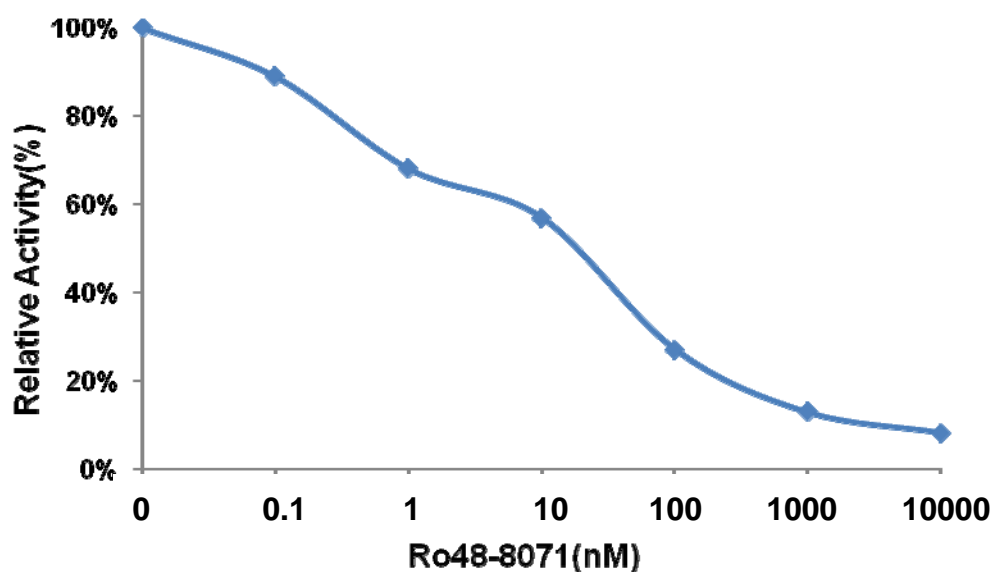
首先將牛肝中的氧化鯊烯環化酵素整段基因的 5' 及 3' 端序列設計兩組限制酶酵素可辨識位置的引子 *Sac* II / *Xba* I 及 *Xho* I / *Xba* I，並利用基因選殖的方式，將具有牛肝中的氧化鯊烯環化酵素基因與酵母菌表現載體 pPICZB 或 pGAPZαA 進行接合作用，成功的獲得 pPICZB/B.L-OSC(*Sac* II/*Xba* I) 和 pGAPZαA/B.L-OSC(*Xho* I/*Xba* I) 重組表現載體，並經由限制酶酵素和 DNA 定序的結果確認。進行酵母菌之電孔轉化作用(electroporation)，先經由限制酶酵素 *Pme* I 切成直鏈形的質體重組 DNA 送入 *P. pastoris*(GS115 和 X33) 中與之進行 DNA 重組，將獲得的電孔重組酵母菌株，利用 PCR、抗 Zeocin 藥性和甲基利用能力的篩選後，將選出之電孔重組酵母菌株利用 2-6-3 所介紹的方法進行重組酵母菌的表現，再利用表現蛋白 N 端有接上六個 Histidine 的特性，以 nickel 層析管柱來分離純化，接著以活性測試以及西方墨點法(Western blotting experiment) 確認，發現都沒有很好的結果，所以這個部分的實驗還要再進一步的修改實驗方法與條件，才會獲得更好的結果。另外，也有文獻利用昆蟲細胞表現系統(Baculovirus expression system) 表現出 *S. cerevisiae* 中的氧化鯊烯環化酵素<sup>78</sup>，我們也嘗試表現，但是也沒有很好的結果。但是由於原本的實驗設計，是想要探討螢光結合抑制劑與氧化鯊烯環化酵素的作用，所以之後還是決定以純化的方式來取得氧化鯊烯環化酵素。

### 3-3 新型結合螢光探針抑制劑

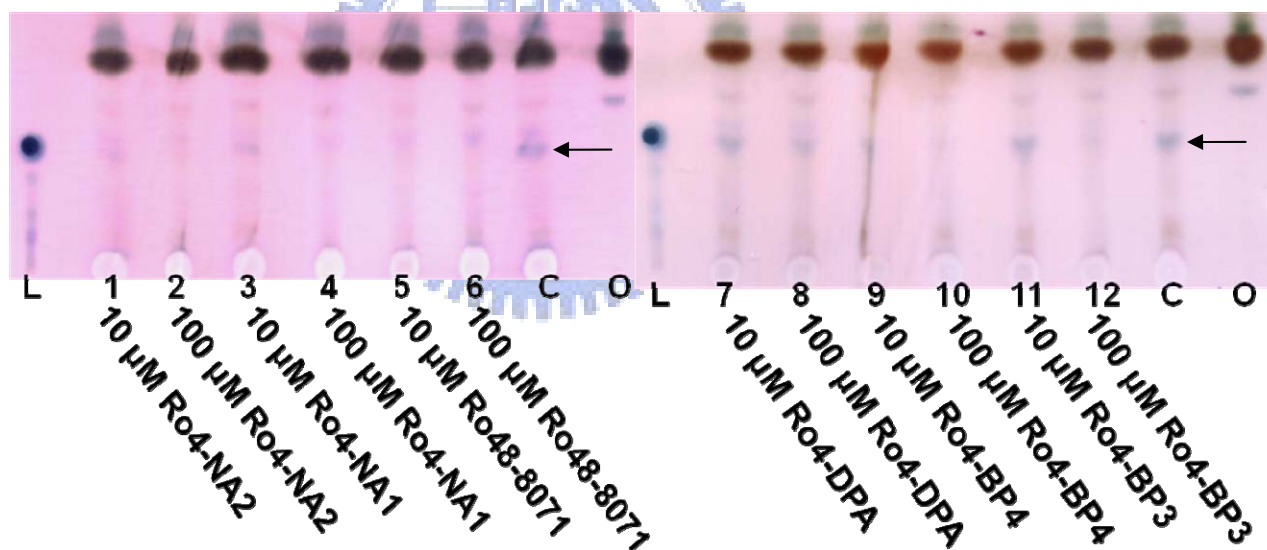
Ro48-8071 是已經被證實出對於許多哺乳類動物肝臟中氧化鯊烯環化酵素具有良好抑制效用的抑制劑，例如人、老鼠及猴子等<sup>27</sup>。而在本實驗中，我們選出幾種具有螢光性質且立體障礙較小的化合物，用化學合成的方法獲得與 Ro48-8071 結合的新型抑制劑，觀察此新型螢光抑制劑對於純化所得的氧化鯊烯環化酵素是否也會產生有效的抑制作用。最後，希望透過此新型的螢光結合抑制劑的螢光以及抑制的特性，能夠進一步瞭解其與酵素之間作用的機制。

#### 3-3-1 螢光標定抑制劑對於酵素的抑制分析

將氧化鯊烯環化酵素在 37°C 及 pH7.4 的條件下，與 0.001 ~ 100 $\mu$ M 不同濃度的新型螢光抑制物進行反應，以沒有加入 Ro48-8071 的微量管作為正控制組，以加入 Ro48-8071 的微量管作為負向控制組。利用 TLC 的分析，從實驗結果顯示，隨著所加入 Ro48-8071 濃度的逐漸增加，酵素的相對活性會逐漸降低；由之前學長所得到的實驗結果可知在 Ro48-8071 濃度 1nM 時尚有超過 60% 的酵素活性，而當濃度提高到 1,000nM (即 1 $\mu$ M) 後，酵素便已經幾乎完全失去活性【圖 3-4】<sup>79</sup>；藉由所得的抑制圖形曲線，推算出 Ro48-8071 對於酵素的抑制效果為 IC<sub>50</sub>  $\cong$  11 nM。由於目前定量上的困難，所以在此以 TLC 分析結果的相對比較得知【圖 3-5】，Ro4-NA1、Ro4-NA2 和 Ro4-BP4 約在 100 $\mu$ M 的濃度時有明顯的抑制活性，而 Ro4-BP3 其抑制活性較 Ro4-NA1、Ro4-NA2 和 Ro4-BP4 稍差，約在濃度 100 $\mu$ M 時有相對稍弱的抑制活性，另外，Ro4-DPA 其抑制效果最差，即使在約 100 $\mu$ M 的濃度時尚無很好的抑制活性。此結果可能是因為 Ro4-DPA 對於氧化鯊烯環化酵素的立體障礙較其他的抑制劑來的大，而其他的螢光修飾則立體障礙較小的原故，所以對於抑制作用效果影響相對較小。



【圖 3-4】 Ro48-8071 對於氧化鯊烯環化酵素的抑制作用<sup>79</sup>

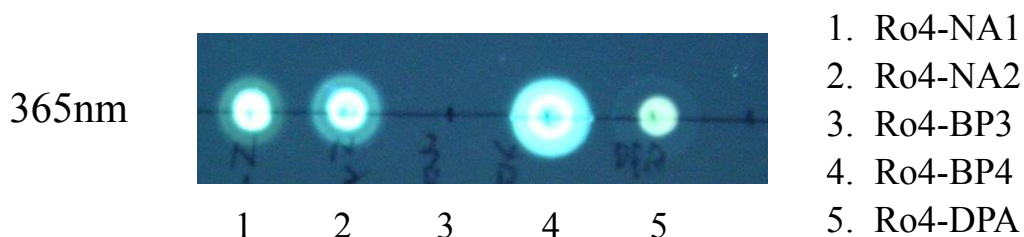


【圖 3-5】 螢光標定抑制劑對於氧化鯊烯環化酵素的抑制作用

而圖 3-5 是以 TLC 分析抑制劑與氧化鯊烯環化酵素的抑制作用。(編號分別代表：L—標準物羊毛硬脂醇；O—合成之氧化鯊烯 (← 標示位子為產物羊毛硬脂醇)；1~4, 7~12—合成之標定螢光化合物的 Ro48-4071 的抑制分析；5~6—Ro48-8071 抑制分析的負向控制組；C—純化之氧化鯊烯環化酵素未加入抑制劑的正向控制組。)

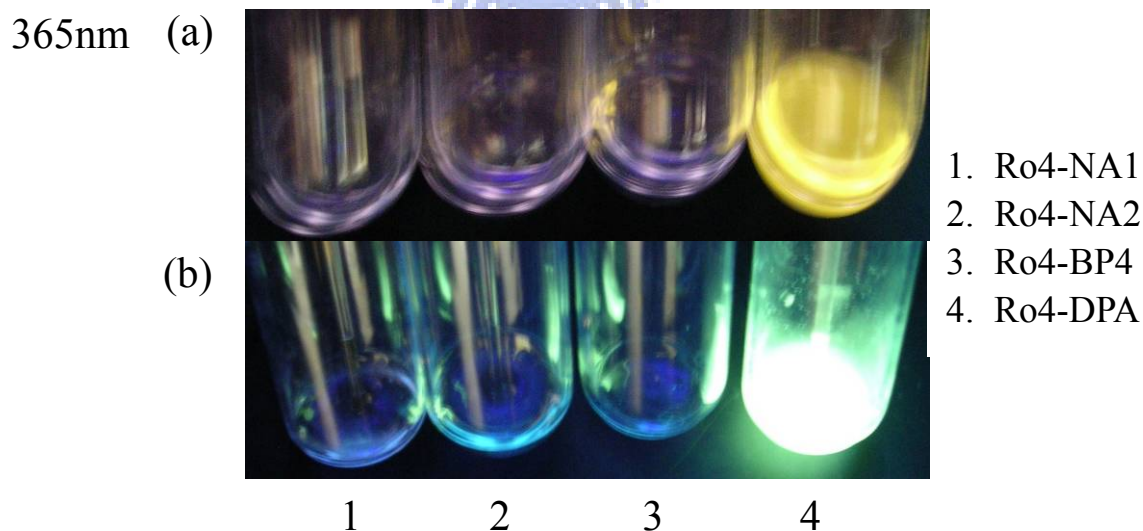
### 3-3-2 溶劑對於螢光標定抑制劑的影響

以 TLC 分析螢光標定抑制劑，發現在 365nm 波長的光的照射下，Ro4-NA1、Ro4-NA2、Ro4-BP4 和 Ro4-DPA 皆有螢光的產生，僅 Ro4-BP3 沒有螢光的產生【圖 3-6】。



【圖 3-6】螢光標定抑制劑在 TLC 下以波長 365nm 光照激發

另外，在實驗中發現 Ro4-NA1、Ro4-NA2、Ro4-BP4 和 Ro4-BP3 在 DMSO 和 5 mM Kpi 的環境下以波長 365nm 光照，都沒有螢光的產生，僅 Ro4-DPA 有螢光的產生分別為橘黃色和藍綠色的螢光【圖 3-7】。由此結果可以推知 Ro4-NA1、Ro4-NA2、Ro4-BP4 和 Ro4-BP3 在溶液中會受到溶液的影響，使其螢光被削弱，甚至沒有螢光的產生。

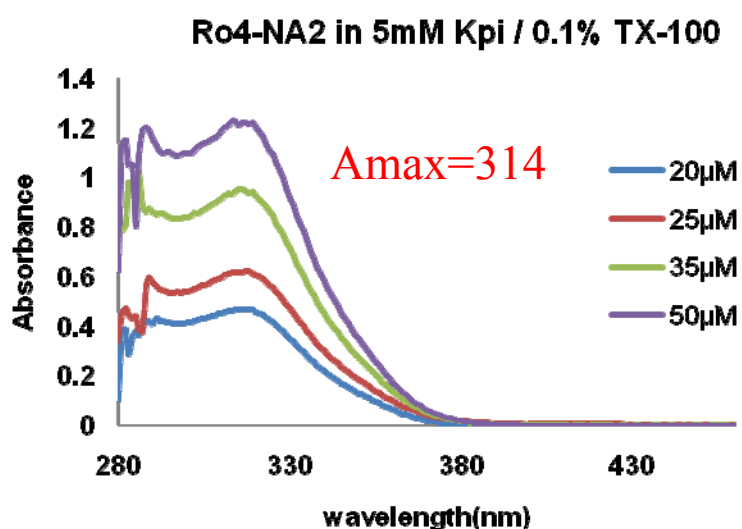
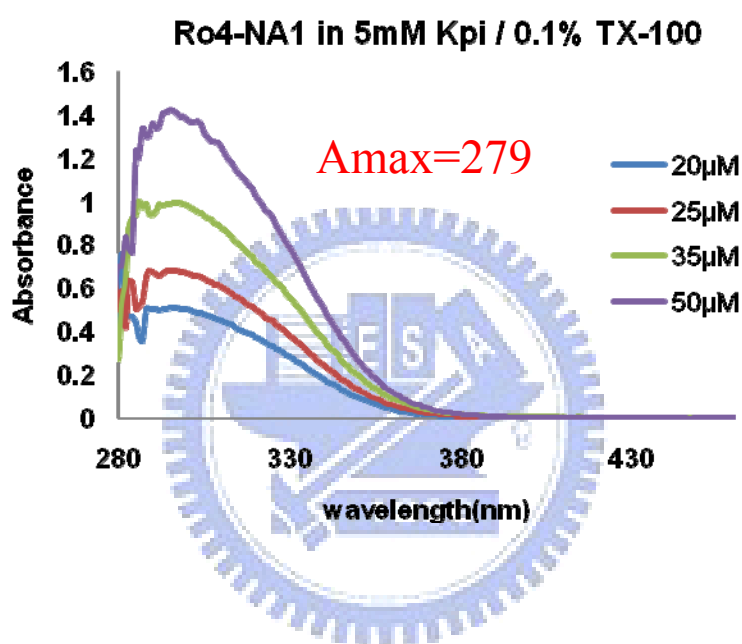


【圖 3-7】螢光標定抑制劑在(a)DMSO 和(b)5 mM Kpi 下以波長 365nm 光照激發

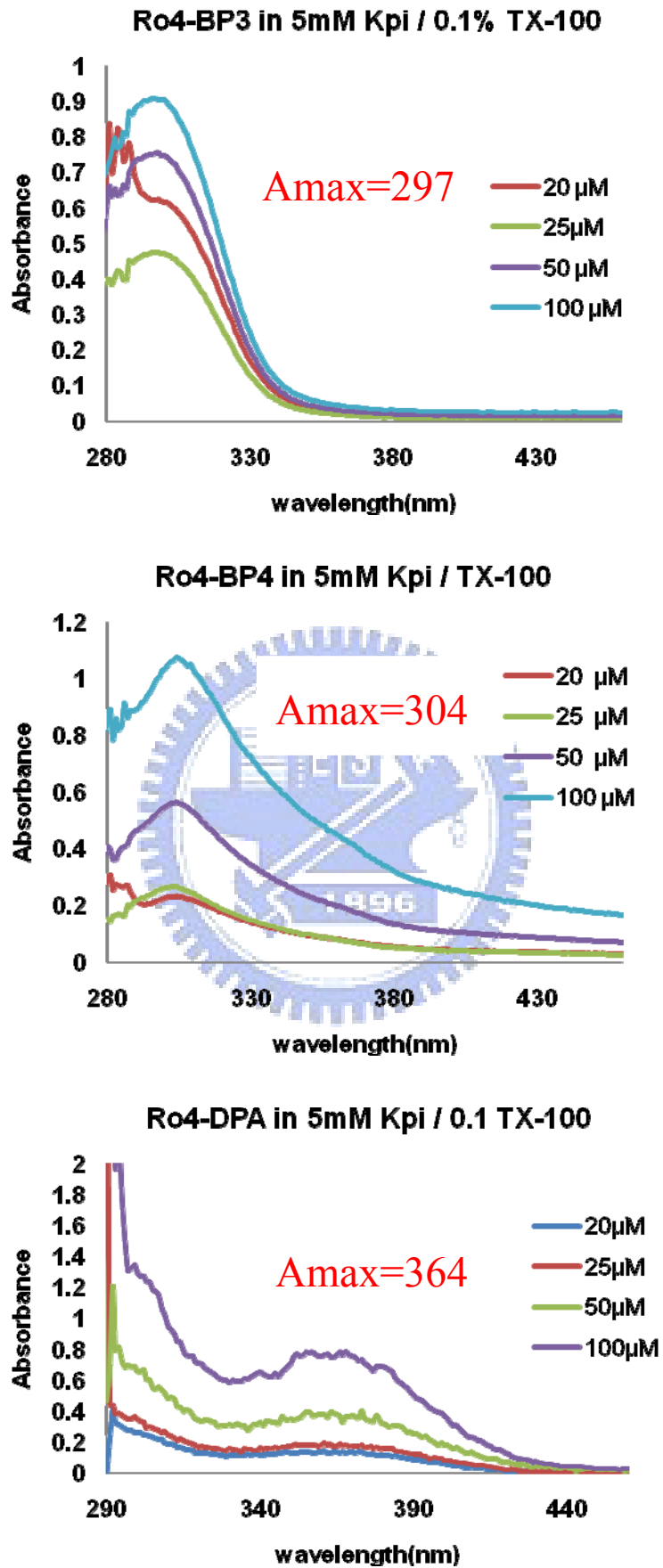


### 3-3-3 螢光標定抑制劑的吸收光譜測量

藉由測量螢光標定抑制劑的吸收光譜範圍，可得知其分別的最大吸收波長，由實驗結果得知 Ro4-NA1 在波長 297nm 有最大吸收值、Ro4-NA2 在波長 314nm 有最大吸收值、Ro4-BP3 在波長 297nm 有最大吸收值、Ro4-BP4 在波長 304nm 有最大吸收值，而 Ro4-DPA 在波長約 364nm 有最大吸收值【圖 3-8】。







【圖 3-8】螢光化合物在 5mM Kpi/0.1% TX-100 環境下吸收光譜範圍

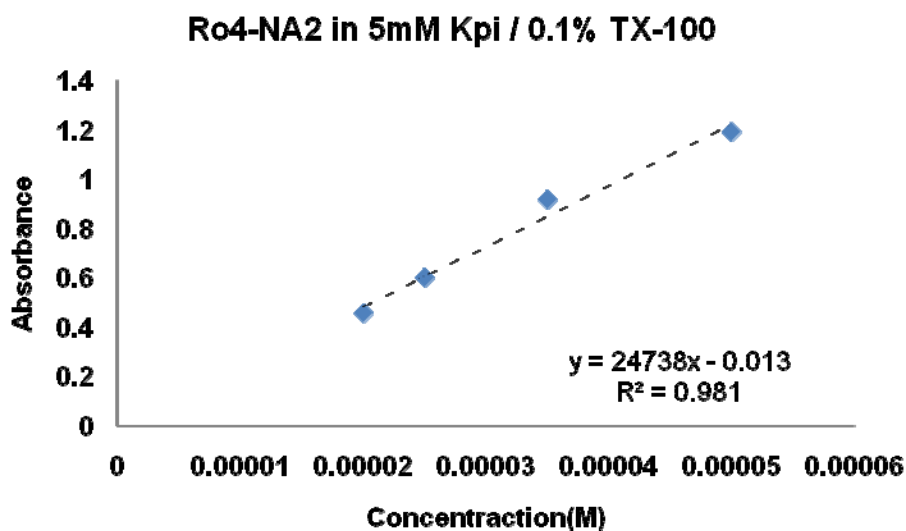
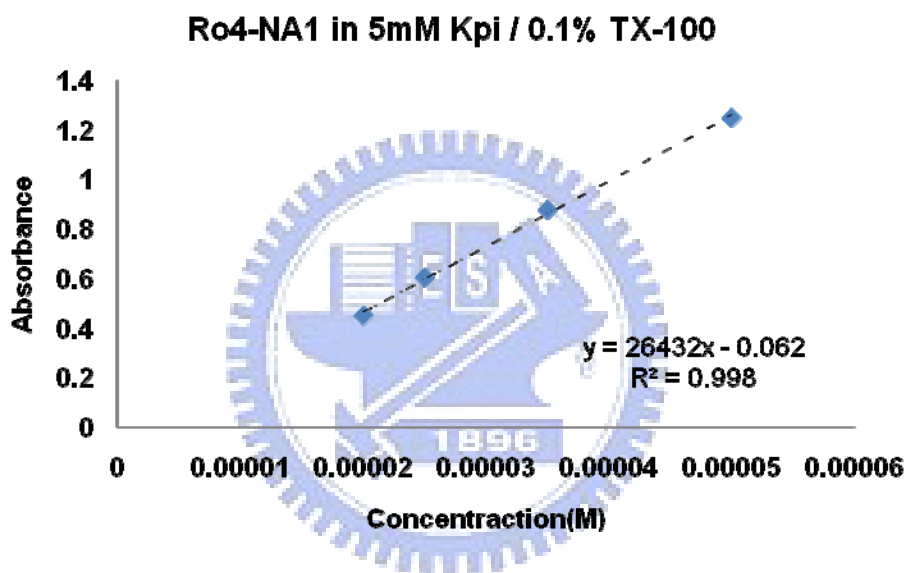
### 3-3-4 螢光標定抑制劑的最大吸收波長的位移現象

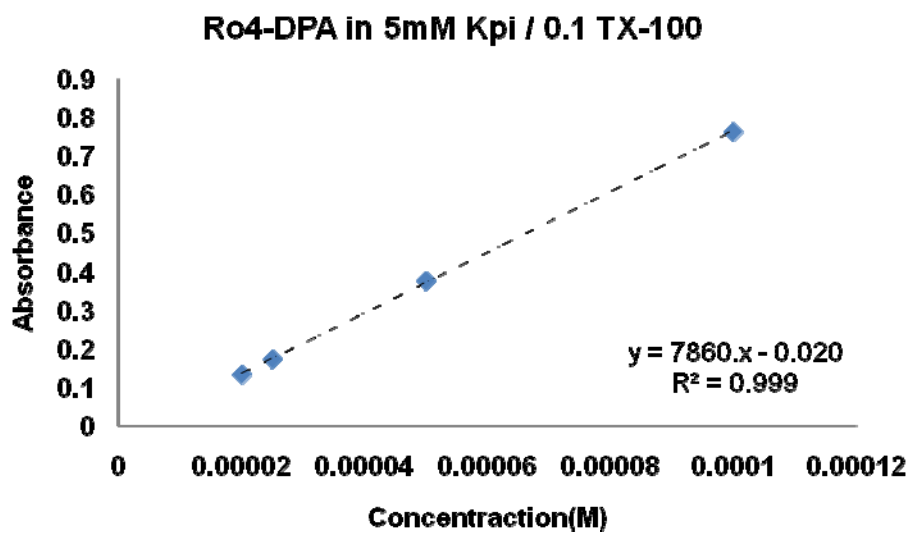
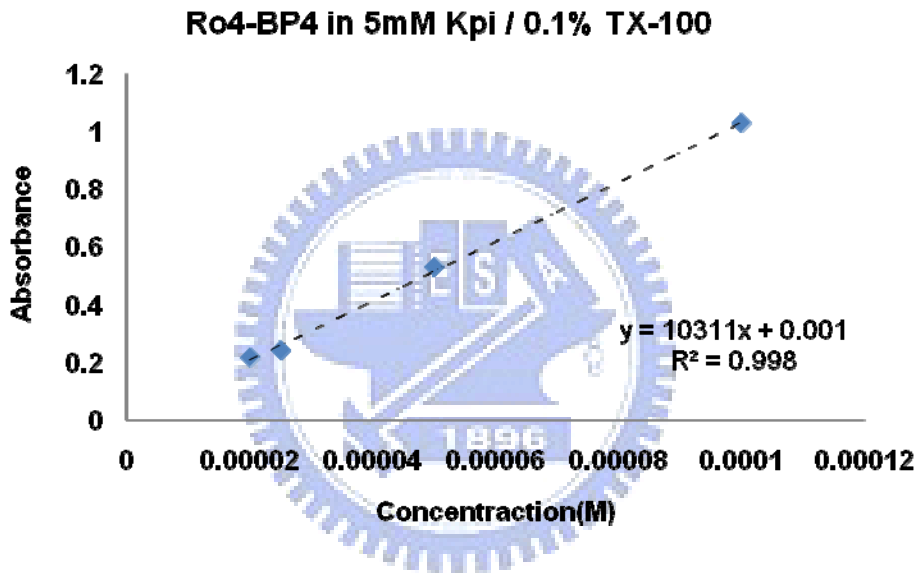
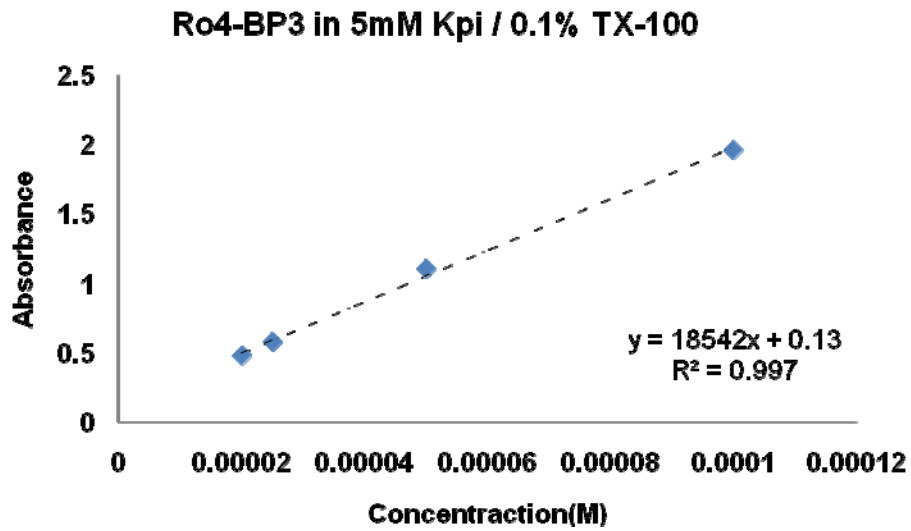
藉由測量螢光標定抑制劑的吸收光譜範圍，可得知其分別的最大吸收波長，由實驗結果得知 Ro4-NA1、Ro4-NA2、Ro4-BP3 和 Ro4-BP4 在波長約 300~310 nm 有最大的吸收值，而 Ro4-DPA 卻在波長約 364nm 時有最大吸收值【圖 3-8】，造成 Ro4-DPA 波長較其他四個螢光抑制劑有紅位移的現象，原因有可能是因為 naphthalene 和 biphenyl 的基團和 benzophenone 結構間有一個角度的形成，而並非共平面的結構，因此造成電子轉移現象的不易形成，所以在約 300 nm 所看到的吸收主要為 carbonyl group 的  $n \rightarrow \pi^*$  吸收。而 DPA 基團較 naphthalene 和 biphenyl 的基團具有剛性的特性，使其可以與 benzophenone 形成較具共平面的結構，進而和 carbonyl group 形成共軛，造成有較好的電子轉移現象，所以和 carbonyl group 的  $\pi \rightarrow \pi^*$  有很好的作用，使得其最大吸收波長較其他四個螢光抑制劑約有 60 nm 的紅位移現象產生。



### 3-3-5 螢光標定抑制劑的莫耳激發係數

依據 Beer's law，可知化合物在溶液中的濃度會與對該波長的吸光值(absorbance)成一正比關係，因此測定吸光值後，即可推知該化合物在溶液中的濃度。Beer's law： $A = \epsilon B C$  ( $A =$  通常為最大吸收波長時的吸收值， $\epsilon =$  莫耳激發係數， $B =$  光通過石英管的長度 cm， $C =$  溶液的濃度 M)。實驗得知，Ro4-NA1 的  $\epsilon_{310}=26432$ 、Ro4-NA2 的  $\epsilon_{310}=24738$ 、Ro4-BP3 的  $\epsilon_{310}=18542$ 、Ro4-BP4 的  $\epsilon_{310}=10311$  和 Ro4-DPA 的  $\epsilon_{365}=7860$  【圖 3-9】。

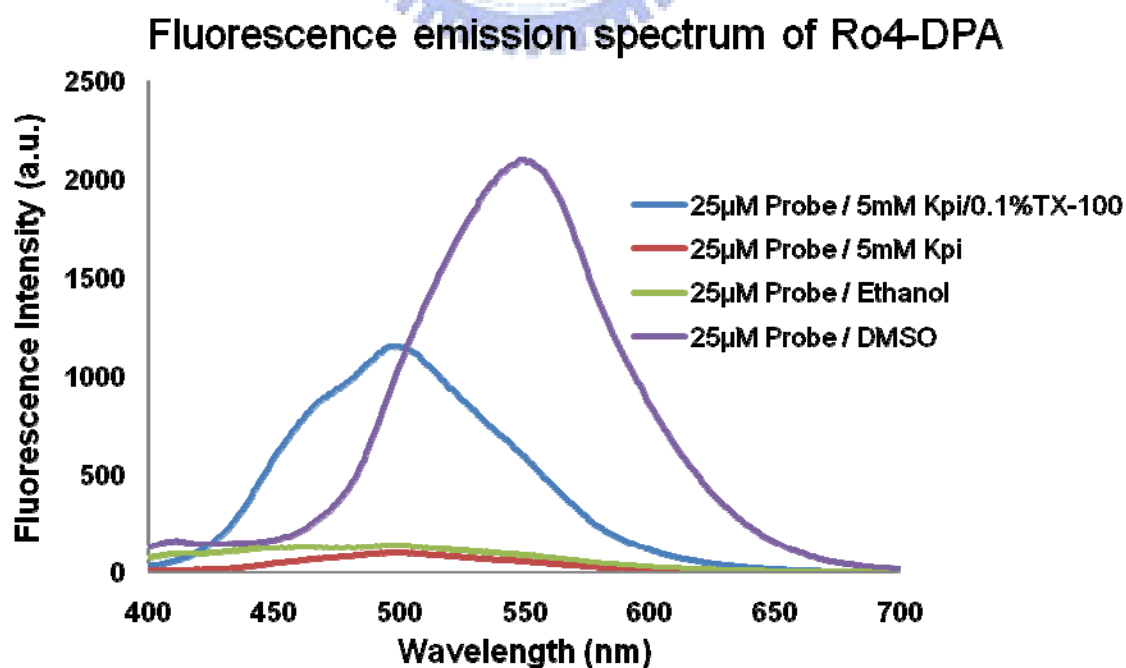




【圖 3-9】在 5mM Kpi / 0.1% TX-100 的環境下的莫耳激發係數

### 3-3-6 不同溶液極性對 Ro4-DPA 的螢光放射光譜的影響

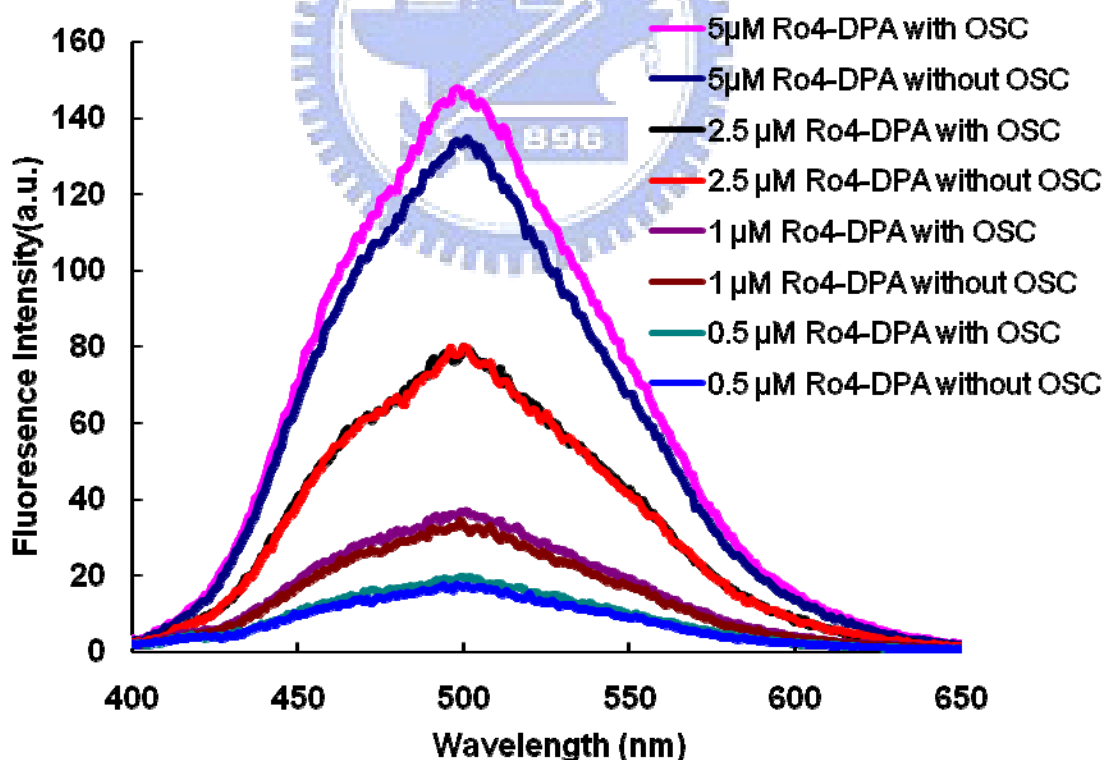
在實驗的過程中發現螢光探針 Ro4-DPA 處在不同極性的溶液中，其螢光發光的顏色或者發光的強度也跟著有所改變，因此便分別測量其在 5mM Kpi、5mM Kpi / 0.1% TX-100、DMSO 和乙醇這四種不同極性環境下的螢光放射光譜。實驗結果發現 25 $\mu$ M 的 Ro4-DPA 在極性較大的乙醇和 5mM Kpi 的環境中其螢光強度被削弱的非常多，而比較在 5mM Kpi 和 5mM Kpi / 0.1% TX-100 的環境下的螢光放射光譜發現，在含有 0.1% TX-100 的狀況下，其螢光放射光譜的強度有大幅增強的現象，推測可能是因為 0.1% TX-100 在 5mM Kpi 中形成微泡(micell)，當 Ro4-DPA 進入極性較低的疏水性微泡中時比起單純在 5mM Kpi 中會增強螢光產生的強度，且在極性較低的 DMSO 環境下其螢光的特性相較於在 5mM Kpi、5mM Kpi / 0.1% TX-100 和乙醇下波長明顯有約 60 nm 的紅移 (red shift) 現象【圖 3-10】。根據這個特性，我們推論其可能在極性較小的環境下，例如，在氧化鯊烯環化酵素的活性區中相較於在酵素外，也就是 5mM Kpi / 0.1% TX-100 的環境下，預期可能會因為所在環境極性的改變而使得放射波長產生位移或增強的現象。



【圖 3-10】 Ro4-DPA 在不同極性溶液環境下的的螢光放射光譜

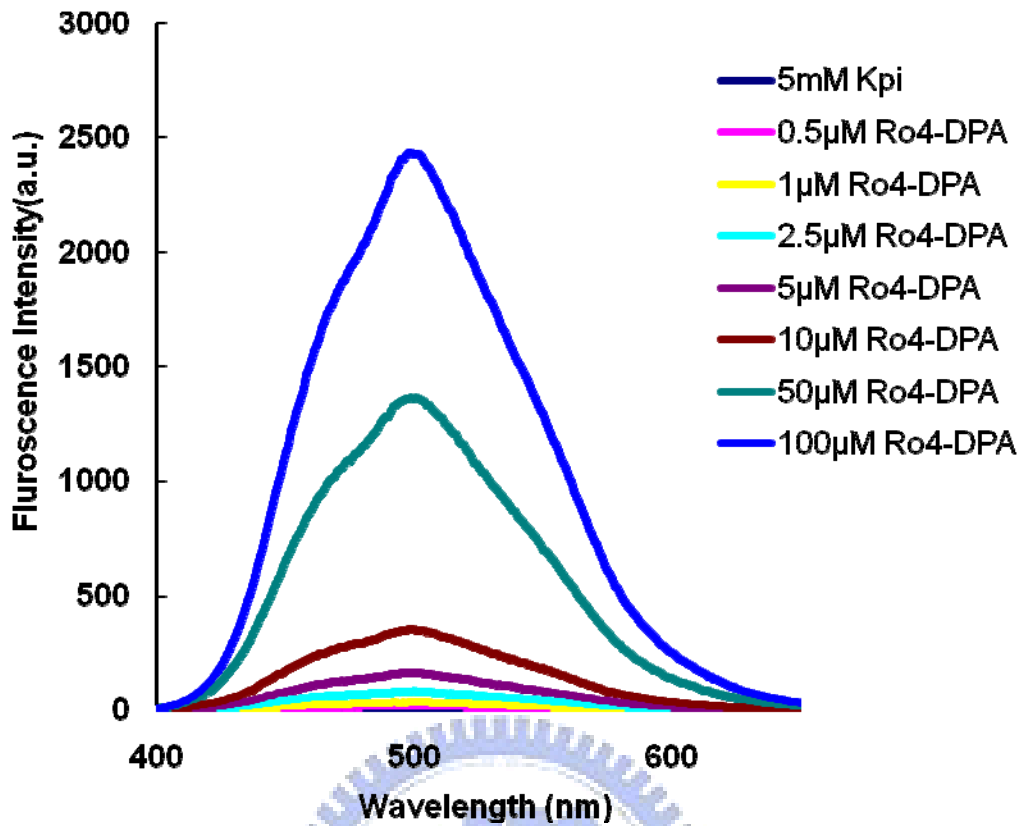
### 3-3-7 螢光探針 Ro4-DPA 與氧化鯊烯環化酵素的相互作用

將螢光探針 Ro4-DPA 分別以  $5\mu\text{M}$ 、 $2.5\mu\text{M}$ 、 $1\mu\text{M}$ 、 $0.5\mu\text{M}$  的濃度與氧化鯊烯環化酵素混合作用，並且以相同濃度的螢光探針 Ro4-DPA 但不加入氧化鯊烯環化酵素混合作用做為負向控制組，比較其螢光放射光譜的改變【圖 3-11】。並以系列稀釋成濃度  $0\mu\text{M}$ 、 $0.5\mu\text{M}$ 、 $1\mu\text{M}$ 、 $2.5\mu\text{M}$ 、 $5\mu\text{M}$ 、 $10\mu\text{M}$ 、 $50\mu\text{M}$  和  $100\mu\text{M}$  的螢光探針 Ro4-DPA/ $5\text{mM}$  Kpi/ $0.1\%$  TX-100 測量其螢光放射光譜【圖 3-12】，做為控制組。由實驗結果發現螢光探針 Ro4-DPA 跟氧化鯊烯環化酵素混合作用並不會改變其螢光放射光譜，由此實驗結果推測可能為螢光探針 Ro4-DPA 並沒有跟氧化鯊烯環化酵素作用，或其雖然有跟氧化鯊烯環化酵素作用但是由於發光的基團並非進入酵素的活性區中，而是保留在酵素的表面，因此造成螢光光譜沒有改變的現象。



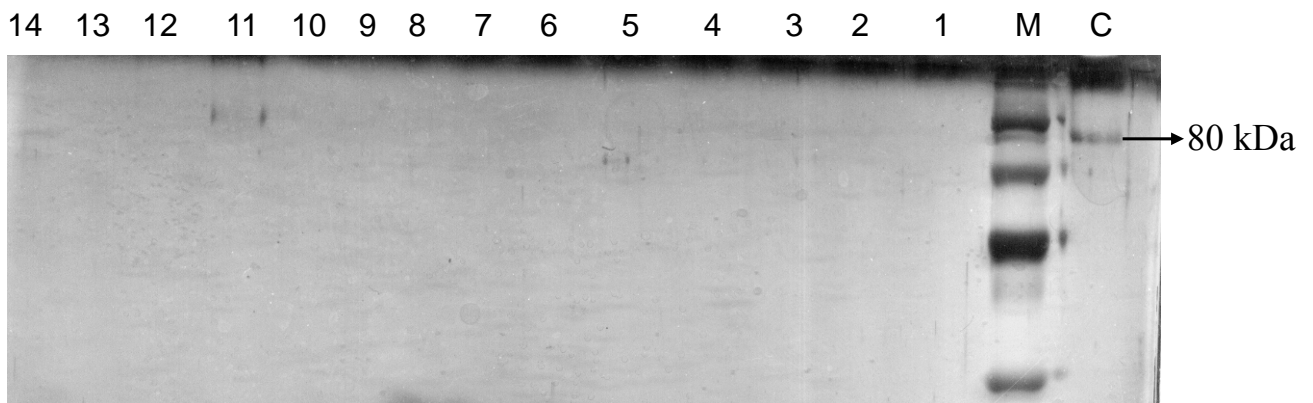
【圖 3-11】 Ro4-DPA 在有/無與氧化鯊烯環化酵素混合螢光放射光譜





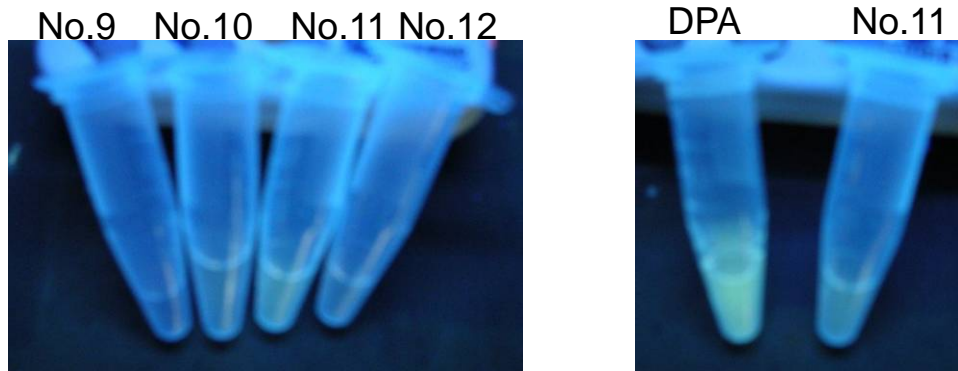
【圖 3-12】不同濃度下 Ro4-DPA 的螢光放射光譜

為了確認螢光探針 Ro4-DPA 是否有跟氧化鯊烯環化酵素作用，將已測螢光放射光譜的 5 $\mu$ M Ro4-DPA 螢光探針與氧化鯊烯環化酵素混合作用的反應微量管，經由去鹽管柱(desalting column)層析法將蛋白質和未與之作用的螢光探針做分離，並將所收集的部分經由 SDS-PAGE 分析。圖 3-13 為 SDS-PAGE 分析銀染後的結果，發現在第 11 個收集部分有氧化鯊烯環化酵素的蛋白質帶。



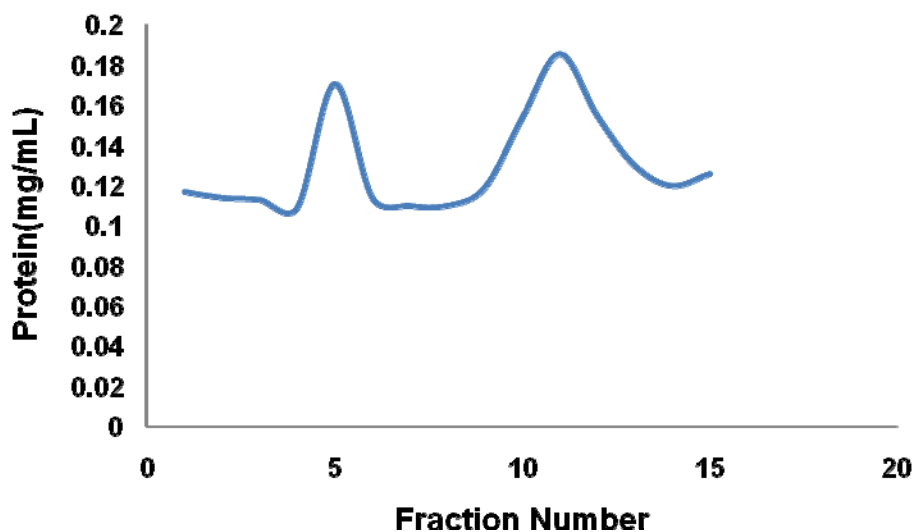
【圖 3-13】通去鹽管柱後所收集部分經由 SDS-PAGE 分析銀染結果。

另外，將第 11 個收集的部分在波長 365nm 的光照下【圖 3-14】，明顯較其他的部分有較強的螢光產生，跟相同反應濃度的 5 $\mu$ M Ro4-DPA 螢光探針做比較，卻顯得螢光較為暗淡，初步證實螢光探針 Ro4-DPA 在通過去鹽管柱層析時有達到與蛋白質分離的效果。

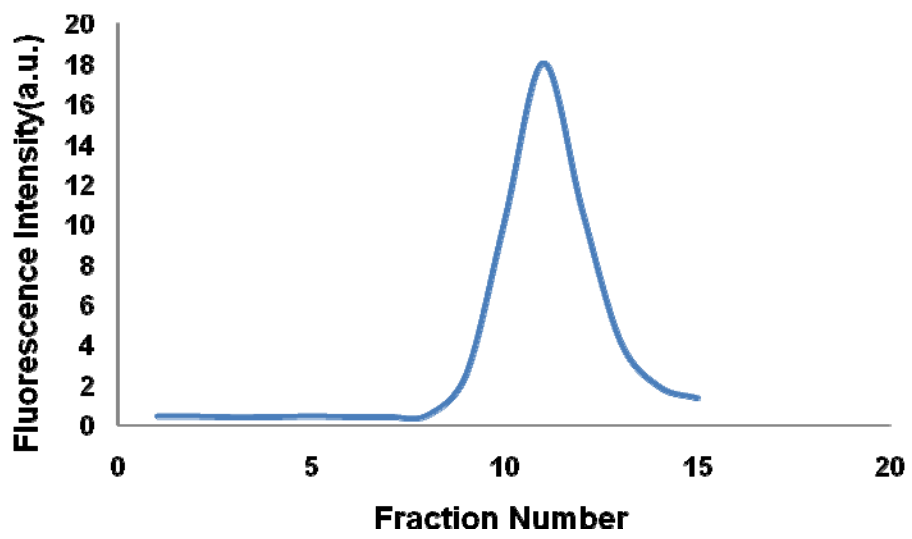


【圖 3-14】去鹽管柱層析結果在波長 365nm 光照

再經由 BCA 的分析以及螢光強度的分析發現【圖 3-15】【圖 3-16】，在有氧化鯊烯環化酵素的第 11 收集部分確實為帶有螢光的部分。經由這些實驗結果初步推測，有可能是因為 DPA 的結構沒有進入酵素的活性區中，而在酵素的表面，致使螢光放射光譜並沒有改變，此後還需要再做進一步的確認，以證明 Ro4-DPA 是真的有與氧化鯊烯環化酵素作用。



【圖 3-15】去鹽管柱層析結果的 BCA 分析



【圖 3-16】去鹽管柱層析結果的螢光強度分析



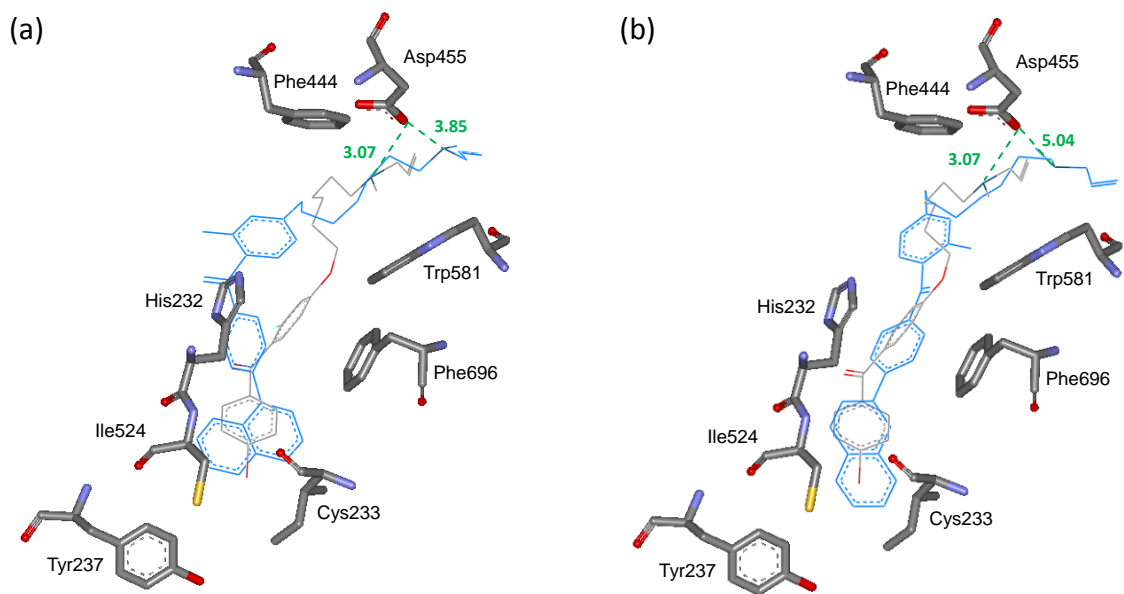
### 3-4 螢光抑制劑與牛的氧化鯊烯環化酵素的入塢交互作用

利用國家高速電腦中心提供的 GOLD 軟體將所合成之螢光抑制劑與牛肝中的氧化鯊烯環化酵素進行入塢實驗，希望能藉此理論計算的結果來探討 Ro48-8071 上所修飾的螢光基團對於氧化鯊烯環化酵素抑制效果的影響。

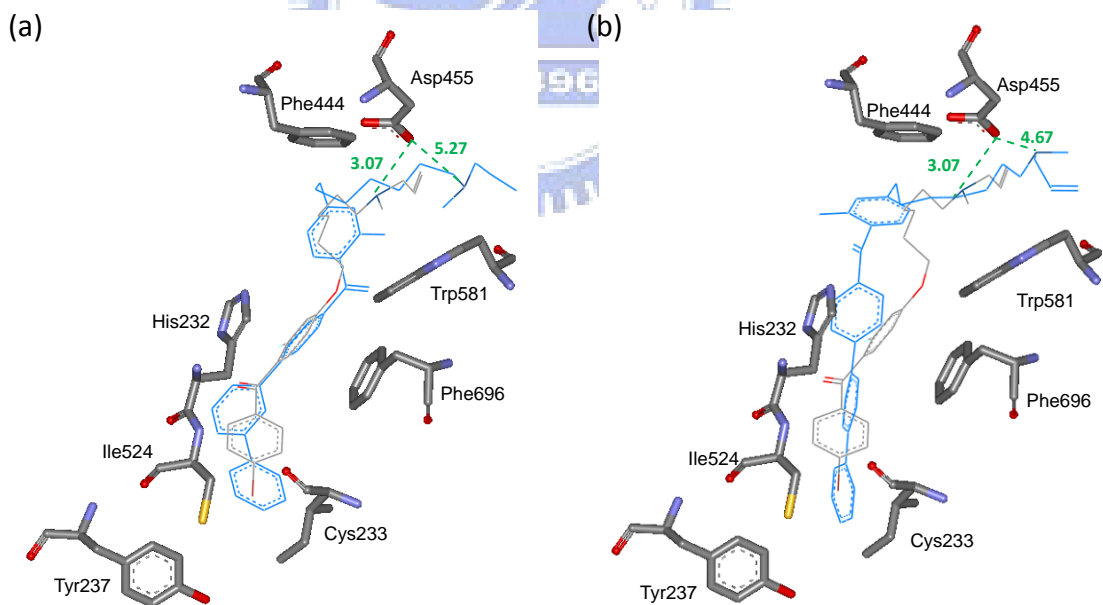
根據不同的螢光抑制劑與牛肝中的氧化鯊烯環化酵素入塢作用的結果，並與人類氧化鯊烯環化酵素結晶結構上 Ro48-8071 相對應在牛肝中的氧化鯊烯環化酵素的活性區中的位置做比較，選出與 Ro48-8071 具有相同位向且分數較高者，另外，入塢作用所計算出來的分數越高代表抑制劑在酵素活性區的能量越低越穩定，也代表其可能為最接近真實情況。由理論計算結果指出，Ro4-NA1 與 Ro48-8071 相同位向且最高得分為 43.4767；Ro4-NA2 與 Ro48-8071 相同位向且最高得分為 70.2055；Ro4-BP3 與 Ro48-8071 相同位向且最高得分為 63.3292；Ro4-BP4 與 Ro48-8071 相同位向且最高得分為 46.6721。另外，Ro4-DPA 在最佳的五十個計算結果中並沒有與 Ro48-8071 具相同位向，並且此五十個計算結果皆為負值，也就是說若其在酵素活性區內會具有很高的能量且非常不穩定，所以幾乎無法進入酵素活性區中，其平均得分為-89.34【圖 3-19】。

根據 2004 年人類氧化鯊烯環化酵素的結晶結構得知 Ro48-8071 結構中三極胺上的氮原子會與胺基酸 Asp455 形成氫鍵作用，而胺基酸 Asp455 也是環化反應起始作用的胺基酸，所以與胺基酸 Asp455 作用影響氧化鯊烯環化酵素對受質進行環化的活性。另外，Ro48-8071 的二苯甲酮基(Benzophenone)會有堆疊於胺基酸 His232 與 Phe696 之間的現象，而由入塢作用的結果發現 Ro4-NA1 與 Ro4-BP4 的結構其三極胺上的氮原子與胺基酸 Asp455 的距離分別為 3.9Å【圖 3-17(a)】和 4.7Å【圖 3-18(b)】，雖然和 Ro48-8071 上的氮原子和胺基酸 Asp455

的距離 3.1 Å 相差不大，但其芳香環的結構卻因為要將整個螢光抑制劑螯合進氧化鯊烯環化酵素的活性區中，而受到螢光基團位向角度與酵素活性區立體效應的影響，使得整個芳香環結構造成較大的扭張力，並且明顯偏離原本提供受質反應的疏水性軌道，因此獲得的分數較低；而 Ro4-NA2 與 Ro4-BP3 的芳香環結構由於基團位向的角度關係，有較小的立體效應，因此進入氧化鯊烯環化酵素的活性區中其芳香環結構會有較小的扭張力，但卻因為此螢光化合物的全長太長造成其四極胺上的氮原子和胺基酸 Asp455 產生較遠的距離，分別為 5.0Å【圖 3-17(b)】和 5.3Å【圖 3-18(a)】，雖然其有較高的分數，但由於距離太遠較不易產生氫鍵作用，因此影響其抑制氧化鯊烯環化酵素的 능력。另外，將 Ro4-DPA 進行入塢作用的篩選，並選出最高分的前五十個計算結果，但卻都沒有得到與 Ro48-8071 具相同位向者，並且所得到的分數皆為負值【圖 3-19】，因此可以推測由於立體效應的影響，使得其無法進入氧化鯊烯環化酵素的活性區中，所以抑制氧化鯊烯環化酵素的 능력會變得很差。因此由入塢作用的理論計算結果可知，利用 Suzuki coupling 的方式將螢光探針修飾上 Ro48-8071 會由於立體效應的影響造成抑制效果的降低，且由之前氧化鯊烯環化酵素的抑制實驗結果發現，合成的螢光抑制劑的確對於氧化鯊烯環化酵素的抑制能力沒有未以螢光探針修飾的 Ro48-8071 來的好。

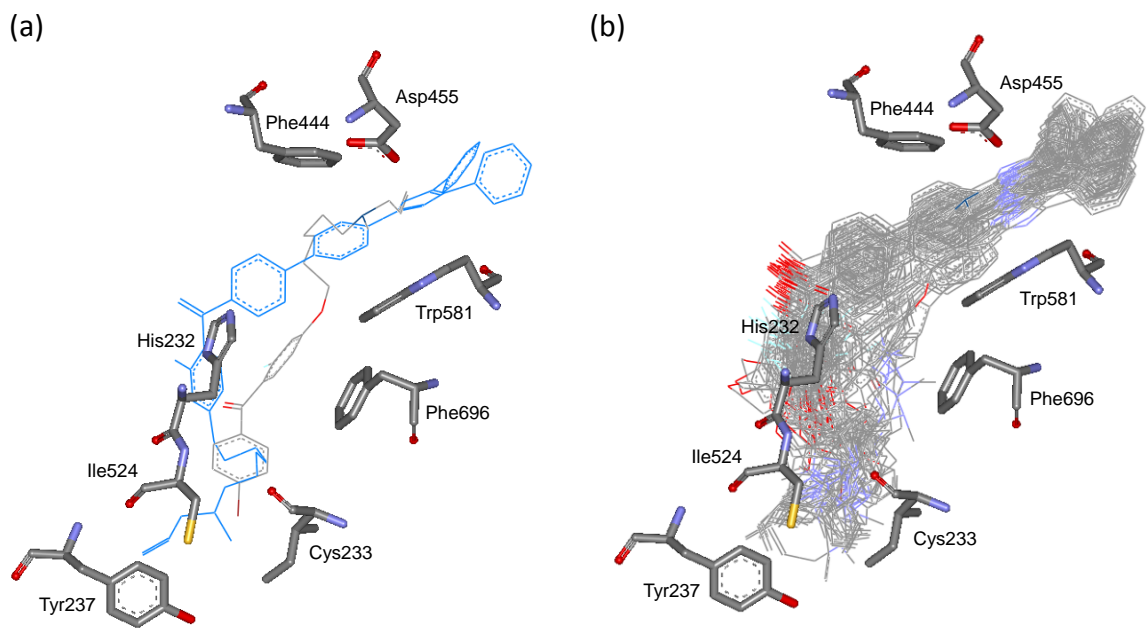


【圖 3-17】 (a)Ro4-NA1 對牛的氧化鯊烯環化酵素進行入塢作用的結果與 (b)Ro4-NA2 對牛的氧化鯊烯環化酵素進行入塢作用的結果



【圖 3-18】 (a)Ro4-BP3 對牛的氧化鯊烯環化酵素進行入塢作用的結果與 (b)Ro4-BP4 對牛的氧化鯊烯環化酵素進行入塢作用的結果





【圖 3-19】(a)Ro4-DPA 入塢作用的結果與 Ro48-8071 比對為不同位向且(b)Ro4-DPA 的 50 個最佳計算結果皆與 Ro48-8071 不同位向



## 第四章 結論與未來展望

1. 從新鮮牛肝中，藉由加入介面活性劑 Triton X-100 穩定氧化鯊烯環化酵素，再經過超高速離心、Q-Sepharose 陰離子交換樹脂、Hydroxyapatite 及 HiTrap Heparin 管柱層析等純化流程，可以順利得到氧化鯊烯環化酵素至均質狀態；並將純化所得的環化酵素經 SDS-PAGE 電泳分析後，以 commassie blue 染色，顯示出分子量約為 80 kDa 的單一蛋白質帶。
2. 在合成 Ro4-NA1、Ro4-NA2、Ro4-BP3 和 Ro4-BP4 的實驗部分，發現利用管柱層析法純化分離這些產物的時候，產物有分成兩個相近的部分被收集的現象。經由 EI-MASS、<sup>1</sup>H NMR spectrometry 和 <sup>13</sup>C NMR spectrometry(DEPT)的分析，發現這兩個被收集的部分，為同一結構。推論可能是在三極胺與六個碳的長碳鏈的結構部分有不同的位向所產生的結果；而在第二個部分收集到的產物，根據光譜以及比對抑制分析實驗結果所作的推測，為三極胺與六個碳的長碳鏈向後摺的結構，造成較大的立體空間障礙，所以皆無抑制氧化鯊烯環化酵素的能力。
3. 經由成功合成出的螢光標定抑制物透過活性測試的實驗發現，還是只有單純沒有修飾過的抑制劑(Ro48-8071)對於牛肝中氧化鯊烯環化酵素具有較顯著的抑制效果，其 IC<sub>50</sub> 可達到僅為 11 nM<sup>37</sup>；此外，Ro4-DPA 其抑制效果最差即使在 100μM 的濃度時也沒有很好的抑制，推測可能是因為 DPA 的結構正好位於氧化鯊烯環化酵素受質通道的開口處，此開口的大小限制了 Ro4-DPA 進入酵素的活性區進行抑制，所以抑制的能力較差；Ro4-NA1 和 Ro4-NA2 其 NA1 和 NA2 的結構較 DPA 的小，所以推測對於酵素受質通道開口的結構有較小的立體障礙，所以其在 100μM 的濃度時即有明顯的抑制效果；而 Ro4-BP4 由於其 BP4 的結構也較 DPA 來的小，而其較狹長的結構特性以及延伸角度由實驗結

果推測較不影響酵素受質通道的結構，所以其在 100 $\mu$ M 的濃度時也有很明顯的抑制效果；另外，Ro4-BP3 雖然 BP3 的結構也較 DPA 的小，但是其延伸的角度造成其對於酵素來說有較 Ro4-BP4 稍大的立體空間障礙，所以造成其產生稍差的抑制效果，但一樣在 100 $\mu$ M 的濃度時有明顯的抑制效果。之後的實驗，也利用了生物資訊的方式(入塢交互作用)加以探討經修飾的螢光化合物與酵素在立體空間上的關係，與未修飾的抑制劑相比較確實造成較弱的抑制效果。

4. 實驗中發現，Ro4-DPA 的螢光在溶液中較其他的螢光標定抑制劑明顯許多，且其在 DMSO 的環境下螢光的特性相較於在 5mM Kpi 下有明顯的紅移(red shift)現象【圖 3-10】，依此特性推論其可能在極性較小的環境下，如氧化鯊烯環化酵素的活性區中相較於在酵素外，也就是 5mM Kpi 的環境下，預期也會有放射波長位移的現象；所以藉由偵測其與酵素作用後螢光放射光譜的改變來進一步確認其與酵素的作用，但發現不管是否與酵素作用其螢光放射光譜都沒變化，但經過去鹽管柱(desalting column)層析法試圖將蛋白質與沒有作用的螢光探針做分離，發現在有蛋白質出現的部分有螢光的現象，初步推測有可能是因為 DPA 的結構沒有進入酵素的活性區中，而在酵素的表面，致使螢光放射光譜沒發現什麼改變，之後還要再做進一步的確認。另外，其他的抑制劑因為在溶液中其螢光的性質都受到溶液的影響而削弱甚至看不到螢光，所以必須改以測量其吸收光的改變來做進一步的偵測。
5. Ro4-NA1 與 Ro4-BP4 經由入塢作用的結果發現，雖然其四極胺上的氮原子與胺基酸 Asp455 的距離並沒有離很遠，但其芳香環的基團卻因為位向的關係造成較大的扭張力；而 Ro4-NA2 與 Ro4-BP3 經由入塢作用的結果發現，雖然其芳香環的基團由於位向的關係有較小的扭張力，但其四極胺上的氮原子與胺基酸 Asp455 的距離卻離很遠，不易產生氫鍵；而 Ro4-DPA 由於螢光

基團的立體障礙影響，其入塢作用實驗所得的結果都顯示其並不容易與氧化鯊烯環化酵素進行作用。由此根據入塢作用的理論計算結果推論，以 Suzuki coupling 的方式將螢光探針對 Ro48-8071 進行修飾的分法，會由於所修飾的芳香環結構所造成的立體效應影響，而使得抑制氧化鯊烯環化酵素活性的能力降低。並且由之前氧化鯊烯環化酵素的抑制實驗結果相互驗證，合成的螢光抑制劑的確對於氧化鯊烯環化酵素的抑制能力沒有尚未以螢光探針修飾的 Ro48-8071 來的好。並根據入塢作用的結果推測，若將 Ro4-NA2 與 Ro4-BP3 的長碳鏈結構的碳鏈長度縮短，使其上的氮原子與胺基酸 Asp455 的距離得以縮短，進而更易於進行氫鍵作用，應可增加螢光抑制劑的抑制效果。

6. Akio Ojida 等人在 2005 年發表的研究成果發現，可以將水相的 Suzuki 合成法利用在蛋白質的修飾上<sup>80</sup>，所以現階段實驗的另一個方向，是需要先取得足量的氧化鯊烯環化酵素，與抑制劑 (Ro48-8071) 進行反應後，利用親和力標記(Photoaffinity labeling) 的方法而使得兩者能夠以共價鍵產生連結(Cross-link)，再利用水相的 Suzuki 合成法，希望能夠成功的將螢光探針與 Ro48-8071 進行偶合，以改善由於立體障礙的原因而影響經由螢光探針修飾後的 Ro48-8071 與氧化鯊烯環化酵素結合的能力，再利用胰蛋白酶(trypsin)或溴化氰(cyanogens bromide, CNBr)等方法將蛋白質切成片段，經由 HPLC 的分析，取得具有螢光的片段進行胺基酸序列分析，以探求 Ro48-8071 與牛肝的氧化鯊烯環化酵素產生結合作用的區域，並瞭解真正活性區域的空間結構；最後，則希望對於氧化鯊烯環化酵素的結構或催化機制作用能夠有更加深入的闡釋。
7. 未來也希望可以利用抑制活性較佳的合成抑制劑如：Ro4-NA1、Ro4-NA2、Ro4-BP3 和 Ro4-BP4 對氧化鯊烯環化酵素進行動力學方面的實驗，來探討抑制劑與酵素之間的作用；另一方面也希

望能夠利用所接上的螢光基團之特性，偵測螢光物質有無與酵素作用其各向異性(anisotropy)的改變來進一步確認是否有與酵素產生交互作用。





## 第五章 參考文獻

1. Allayee, H.; Laffitte, B. A.; Lusic, A. J., Biochemistry. An absorbing study of cholesterol. *Science* **2000**, 290, (5497), 1709-11.
2. Vance, D. E.; Van den Bosch, H., Cholesterol in the year 2000. *Biochim Biophys Acta* **2000**, 1529, (1-3), 1-8.
3. Harvey, P. C. C. a. R. A., *Lippincotts Illustrated Review Biochemistry*. 2/e ed.; Lippincott Williams & Wilkins: 2001; p 205-227 ; 173-185.
4. Simons, K.; Toomre, D., Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2000**, 1, (1), 31-9.
5. Simons, K.; Ehehalt, R., Cholesterol, lipid rafts, and disease. *J Clin Invest* **2002**, 110, (5), 597-603.
6. Chugh, A.; Ray, A.; Gupta, J. B., Squalene epoxidase as hypocholesterolemic drug target revisited. *Prog Lipid Res* **2003**, 42, (1), 37-50.
7. Dougherty, D. A., Cation-pi interactions in chemistry and biology: a new view of benzene, Phe, Tyr, and Trp. *Science* **1996**, 271, (5246), 163-8.
8. Grundy, S. M., HMG-CoA reductase inhibitors for treatment of hypercholesterolemia. *N Engl J Med* **1988**, 319, (1), 24-33.
9. Abe, I., Enzymatic Cyclization of Squalene and Oxidosqualene to Sterols and Triterpenes. *Chem. Rev.* 1993, pp 2189-2206.
10. Shi, Z.; Buntel, C. J.; Griffin, J. H., Isolation and characterization of the gene encoding 2,3-oxidosqualene-lanosterol cyclase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1994**, 91, (15), 7370-4.
11. Baker, C. H.; Matsuda, S. P.; Liu, D. R.; Corey, E. J., Molecular cloning of the human gene encoding lanosterol synthase from a liver cDNA library. *Biochem Biophys Res Commun* **1995**, 213, (1), 154-60.
12. Poralla, K.; Hewelt, A.; Prestwich, G. D.; Abe, I.; Reipen, I.; Sprenger, G., A specific amino acid repeat in squalene and oxidosqualene cyclases. *Trends Biochem Sci* **1994**, 19, (4), 157-8.
13. Rosey, E. L.; Stewart, G. C., Nucleotide and deduced amino acid sequences of the lacR, lacABCD, and lacFE genes encoding the repressor, tagatose 6-phosphate gene cluster, and sugar-specific phosphotransferase system components of the lactose operon of *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol* **1992**, 174, (19), 6159-70.
14. Schulz-Gasch, T.; Stahl, M., Mechanistic insights into oxidosqualene cyclizations through homology modeling. *J Comput Chem* **2003**, 24, (6), 741-53.



15. Wu, T. K.; Griffin, J. H., Conversion of a plant oxidosqualene-cycloartenol synthase to an oxidosqualene-lanosterol cyclase by random mutagenesis. *Biochemistry* **2002**, 41, (26), 8238-44.
16. Bloch, K., The biological synthesis of cholesterol. *Science* **1965**, 150, 19-28.
17. Huff, M. W.; Telford, D. E., Lord of the rings--the mechanism for oxidosqualene:lanosterol cyclase becomes crystal clear. *Trends Pharmacol Sci* **2005**, 26, (7), 335-40.
18. Wendt, K. U.; Poralla, K.; Schulz, G. E., Structure and function of a squalene cyclase. *Science* **1997**, 277, (5333), 1811-5.
19. Hoshino, T., Squalene-hopene cyclase: catalytic mechanism and substrate recognition. *Chem. Commun. (Camb.)* **2002**, 4, 291-310.
20. Thoma, R.; Schulz-Gasch, T.; D'Arcy, B.; Benz, J.; Aebi, J.; Dehmlow, H.; Hennig, M.; Stihle, M.; Ruf, A., Insight into steroid scaffold formation from the structure of human oxidosqualene cyclase. *Nature* **2004**, 432, (7013), 118-22.
21. Nelson, J. A., Biosynthesis of 24,25-epoxycholesterol from squalene 2,3;22,23-dioxide. *J. Biol. Chem.* **1981**, 256, 1067-1068.
22. Boutaud, O.; Dolis, D.; Schuber, F., Preferential cyclization of 2,3(S):22(S),23-dioxidosqualene by mammalian 2,3-oxidosqualene-lanosterol cyclase. *Biochem Biophys Res Commun* **1992**, 188, (2), 898-904.
23. Rowe, A. H.; Argmann, C. A.; Edwards, J. Y.; Sawyez, C. G.; Morand, O. H.; Hegele, R. A.; Huff, M. W., Enhanced synthesis of the oxysterol 24(S),25-epoxycholesterol in macrophages by inhibitors of 2,3-oxidosqualene:lanosterol cyclase: a novel mechanism for the attenuation of foam cell formation. *Circ Res* **2003**, 93, (8), 717-25.
24. Ory, D. S., Nuclear receptor signaling in the control of cholesterol homeostasis: have the orphans found a home? *Circ. Res.* **2004**, 95, 660-670.
25. Dollis, D.; Schuber, F., Effects of a 2,3-oxidosqualene-lanosterol cyclase inhibitor 2,3:22,23-dioxidosqualene and 24,25-epoxycholesterol on the regulation of cholesterol biosynthesis in human hepatoma cell line HepG2. *Biochem Pharmacol* **1994**, 48, (1), 49-57.
26. Mark, M.; Muller, P.; Maier, R.; Eisele, B., Effects of a novel 2,3-oxidosqualene cyclase inhibitor on the regulation of cholesterol biosynthesis in HepG2 cells. *J Lipid Res* **1996**, 37, (1), 148-58.
27. Morand, O. H.; Aebi, J. D.; Dehmlow, H.; Ji, Y. H.; Gains, N.; Lengsfeld,

- H.; Himber, J., Ro 48-8.071, a new 2,3-oxidosqualene:lanosterol cyclase inhibitor lowering plasma cholesterol in hamsters, squirrel monkeys, and minipigs: comparison to simvastatin. *J Lipid Res* **1997**, 38, (2), 373-90.
28. Peffley, D. M.; Gayen, A. K.; Morand, O. H., Down-regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase mRNA levels and synthesis in syrian hamster C100 cells by the oxidosqualene cyclase inhibitor [4'-(6-allyl-ethyl-amino-hexyloxy)-2'-fluoro-phenyl]-(4-bromophenyl)-methanone (Ro 48-8071): comparison to simvastatin. *Biochem Pharmacol* **1998**, 56, (4), 439-49.
29. Gardner RG, S. H., Matsuda SPT, Hampton RY., An oxysterol-derived positive signal for 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase degradation in yeast. *J Biol Chem.* **2001**, 276, 8681-8694.
30. Janowski BA, S. B., Russell DW., The hypocholesterolemic agent LY295427 reverses suppression of sterol regulatory element-binding protein processing mediated by oxysterols. *J Biol Chem* **2001**, 276, 45408-45416.
31. Telford, D. E.; Lipson, S. M.; Barrett, P. H.; Sutherland, B. G.; Edwards, J. Y.; Aebi, J. D.; Dehmlow, H.; Morand, O. H.; Huff, M. W., A novel inhibitor of oxidosqualene:lanosterol cyclase inhibits very low-density lipoprotein apolipoprotein B100 (apoB100) production and enhances low-density lipoprotein apoB100 catabolism through marked reduction in hepatic cholesterol content. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2005**, 25, (12), 2608-14.
32. Corey, E. J. M., S. P. T. , Purification of the 2,3-Oxidosqualene-lanosterol Cyclase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 8172-8174.
33. Abe, I.; Zheng, Y. F.; Prestwich, G. D., Photoaffinity labeling of oxidosqualene cyclase and squalene cyclase by a benzophenone-containing inhibitor. *Biochemistry* **1998**, 37, (17), 5779-84.
34. Kusano, M., Purification and some properties of squalene-2,3-epoxide : lanosterol cyclase from rat liver. *chem. Pharm. Bull.* **1991**, 39, 239~241.
35. Moore, W. R.; Schatzman, G. L., Purification of 2,3-oxidosqualene cyclase from rat liver. *J Biol Chem* **1992**, 267, (31), 22003-6.
36. Abe, I.; Bai, M.; Xiao, X. Y.; Prestwich, G. D., Affinity labeling of vertebrate oxidosqualene cyclases with a tritiated suicide substrate. *Biochem Biophys Res Commun* **1992**, 187, (1), 32-8.

37. Wu, T. K.; Huang, C. Y.; Ko, C. Y.; Chang, C. H.; Chen, Y. J.; Liao, H. K., Purification, tandem mass characterization, and inhibition studies of oxidosqualene-lanosterol cyclase enzyme from bovine liver. *Arch Biochem Biophys* **2004**, 421, (1), 42-53.
38. Cattel, L.; Ceruti, M., Inhibitors of 2,3-oxidosqualene cyclase as tools for studying the mechanism and function of the enzyme. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **1998**, 33, (5), 353-73.
39. Wendt, K. U.; Lenhart, A.; Schulz, G. E., The structure of the membrane protein squalene-hopene cyclase at 2.0 Å resolution. *J Mol Biol* **1999**, 286, (1), 175-87.
40. Corey, E. J.; Cheng, H.; Baker, C. H.; Matsuda, S. P. T.; Li, D.; Song, X., Methodology for the Preparation of Pure Recombinant *S. cerevisiae* Lanosterol Synthase Using a Baculovirus Expression System. Evidence That Oxirane Cleavage and A-Ring Formation Are Concerted in the Biosynthesis of Lanosterol from 2,3-Oxidosqualene. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 1277-1288
41. Dang, T.; Abe, I.; Zheng, Y. F.; Prestwich, G. D., The binding site for an inhibitor of squalene-hopene cyclase determined using photoaffinity labeling and molecular modeling. *Chem Biol* **1999**, 6, (6), 333-41.
42. Lenhart, A.; Weihofen, W. A.; Pleschke, A. E.; Schulz, G. E., Crystal structure of a squalene cyclase in complex with the potential anticholesteremic drug Ro48-8071. *Chem Biol* **2002**, 9, (5), 639-45.
43. Shuster, J. R., Regulated transcriptional systems for the production of proteins in yeast: regulation by carbon source. *Yeast Genetic Engineering* **1989**.
44. Hinnen A, M. B., Heim J., Heterologous gene expression in yeast. *Yeast Genetic Engineering* **1989**, 193-214.
45. Smith RA, D. M., Moir DT, Heterologous protein secretion from yeast. *Science* **1985**, 229, 1219-1224.
46. Zsebo KM, L. H., Fieschko JC, Goldstein L, Davis J, Duker K, Suggs SV, Lai PH, Bitter GA, Protein secretion from *Saccharomyces cerevisiae* directed by the prepro- $\alpha$ -factor leader region. *J Biol Chem* **1986**, 261, 5858-5865.
47. de Nobel JG, B. J., Passage of molecules through yeast cell wall: a brief essay-review. *Yeast* **1991**, 7, 313-323.
48. Cregg JM, T. J., Stillman C, Siegel R, Akong M, Craig WS, Buckholz RG, Madden KR, Kellaris PA, Davis GR, Smiley BL, Cruze J, Torregrossa R, Velicelebi G, Thill GP, High-level expression and efficient assembly of

- hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. *BioTechnology* **1987**, 5, 479-485.
49. Janowicz ZA, M. K., Merckelbach A, Jacobs E, Harford N, Comberbach M, Hollenberg CP, Simultaneous expression of the S and L surface antigen of hepatitis B, and formation of mixed particles in the methylotropic yeast, *Hansenula polymorpha*. *Yeast* **1991**, 7, 431-433.
  50. Broker M, B. O., New expression vector for the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *FEBS Lett* **1989**, 248, 105-110.
  51. Franke AE, K. F., Eisenhard ME, Geoghegan KF, Danley DE, de Zeeuw JR, o'Donnell MM, Gollaher MG, Davidow LS, Expression and secretion of bovine prochymosin in *Yarrowia lipotica*. *Devel Ind Microbiol* **1988**, 29, 43-57.
  52. van de Berg JA, v. d. L. K., van Ooyen JJ, Renniers TCH, Rietveld D, Schaap A, Brake J, Bishop RJ, Schultz K, Moyer D, Richman M, Shuster JR, *Kluyveromyces* as a host for heterologous gene expression: expression and secretion of prochymosin. *Bio Technology* **1990**, 8, 135-139.
  53. Piontek M, H. C., Strasser AWM, *Schwanniomyces occidentalis*: a promising system for the expression of foreign gene. *Yeast* **1990**, 6, 422-430.
  54. Ogata K, N. H., Ohsugi M, A yeast capable of utilizing methanol. *Agric BiolChem* **1969**, 33, 1519-1520.
  55. Cregg JM, M. K., Barringer KJ, Thill GP, Stillman CA, Functional characterization of the two alcohol oxidase gene from the yeast *Pichia pastoris*. *Mol Cell Biol* **1989**, 9, 1316-1323.
  56. Egli T, v. D. J., Veenhuis M, Harder W, Fiechter A, Methanol metabolism in yeasts: regulation of the synthesis of catabolic enzymes. *Arch Microbiol* **1980**, 124, 115-121.
  57. Veenhuis M, v. D. J., Harder W, The significance of peroxisomes in the metabolism of one-carbon compounds in yeast. *Adv Microb Physiol* **1983**, 24, 1-82.
  58. Couderc R, B. J., Oxidation of methanol by the yeast *Pichia pastoris* : purification and properties of alcohol oxidase. *ABC* **1980**, 44, 2279-2289.
  59. Waterham HR, D. M., Koutz PJ, Lair SV Cregg JM, Isolation of the *Pichia pastoris* glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase gene and regulation and use of its promoter. *Gene* **1997**, 186, 37-44.
  60. Shen S, S. G., Jeffries TW, Cregg JM, A strong nitrogen source-regulated promoter for controlled expression of foreign gene in the yeast *Pichia*

- pastoris. *Gene* **1998**, 216, 93-102.
61. Liu H, T. X., Russell KA, Veenhuis M, Cregg JM., PER3, a gene required for peroxisome biogenesis in *Pichia pastoris*, encodes a peroxisomal membrane protein involved in protein import. *J Biol Chem* **1995**, 270, 10940-10951.
  62. Sears IB, O. C. J., Rossanese OW, Glick BS, A versatile set of vectors for constitutive and regulated gene expression in *Pichia pastoris*. *Yeast* **1998**, 44, 738-790.
  63. Cregg JM, M. K., Use of site-specific recombination to regenerate selectable markers. *Mol Gen Genet* **1993**, 219, 320-323.
  64. Cregg JM, M. K., Use of site-specific recombination to regenerate selectable markers. *Mol Gen Genet* **1989**, 219, 320-323.
  65. Scorer CA, C. J., McCombie WR, Romanos MA, Sreekrishna K., Rapid selection using G418 of high copy number transformants of *Pichia pastoris* for high-level foreign gene expression. *Biotechnology* **1994**, 12, 181-184.
  66. Brocca S, S.-D. C., Lotti M, Alberghina L, Schmid DR., Design, total synthesis, and functional over expression of the *Candida rugosa* lip1 gene coding for a major industrial lipase. *Protein Sci* **1998**, 7, 1415-1422.
  67. Kurjan J, H. I., Structure of the yeast pheromone gene (MF alpha) : a putative alpha-factor precursor contains four tandem copies of mature alpha- factor. *Cell* **1982**, 30, 933-943.
  68. Martínez-Ruiz A, M. d. P. A., Lacadena J, Mancheño JM, Oñaderra M, López-Otin C, Gavianes AJG, Secretion of recombinant pro- and mature fungal a-sarcin ribotoxin by the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*: the Lys-Arg motif is required for maturation. *Protein Expr Purif* **1998**, 12, 315-322.
  69. Kjeldsen T, P. A., Hach M, Secretory expression and characterization of insulin in *Pichia pastoris*. *Biotechnol Appl Biochem* **1999**, 29, 79-86.
  70. Romanos M, Advances in the use of *Pichia pastoris* for high- level gene expression. *Biotechnology* **1995**, 6, 527-533.
  71. Bauer, D. C., HMG CoA reductase inhibitors and the skeleton: a comprehensive review. *Osteoporos Int* **2003**, 14, (4), 273-82.
  72. Goldman, J. A.; Fishman, A. B.; Lee, J. E.; Johnson, R. J., The role of cholesterol-lowering agents in drug-induced rhabdomyolysis and polymyositis. *Arthritis Rheum* **1989**, 32, (3), 358-9.
  73. Wendt, K. U.; Schulz, G. E.; Corey, E. J.; Liu, D. R., Enzyme Mechanisms for Polycyclic Triterpene Formation. *Angew Chem Int Ed*



- Engl* **2000**, 39, (16), 2812-2833.
74. DiDomenico, B., Novel antifungal drugs. *Curr Opin Microbiol* **1999**, 2, (5), 509-15.
75. Lenhart, A.; Reinert, D. J.; Aebi, J. D.; Dehmlow, H.; Morand, O. H.; Schulz, G. E., Binding structures and potencies of oxidosqualene cyclase inhibitors with the homologous squalene-hopene cyclase. *J Med Chem* **2003**, 46, (11), 2083-92.
76. Abe, I. E. A., Purification of 2,3-oxidosqualene : beta-amyrin cyclase from pea seedlings. *chem. Pharm. Bull.* **1989**, 37, 536~538.
77. Armin Ruf, F. M. U., Brigitte D'Arcy, Martine Stihle, Eric Kusznir, Corinne Handschin, Olivier H. Morand, and Ralf Thoma, The monotopic membrane protein human oxidosqualene cyclase is active as monomer. *Biochem Biophys Res Commun* **2004**, 315, (2), 247-54.
78. E. J. Corey, H. C., C. Hunter Baker, Seiichi P. T. Matsuda, Ding Li, and Xuelei Song, Methodology for the Preparation of Pure Recombinant *S. cerevisiae* Lanosterol Synthase Using a Baculovirus Expression System. Evidence That Oxirane Cleavage and A-Ring Formation Are Concerted in the Biosynthesis of Lanosterol from 2,3-Oxidosqualene. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 1277-1288.
79. 柯震宇, 牛肝中氧化鯊烯-羊毛硬脂醇環化酵素之生化特性與抑制作用的探討. 碩士論文, 國立交通大學生物科技研究所 **2002**.
80. Akio Ojida, H. T., Noriyuki Kasagi and Itaru Hamachi, Suzuki coupling for protein modification. *Tetrahedron Letters* **2005**, 46, 3301-3305.

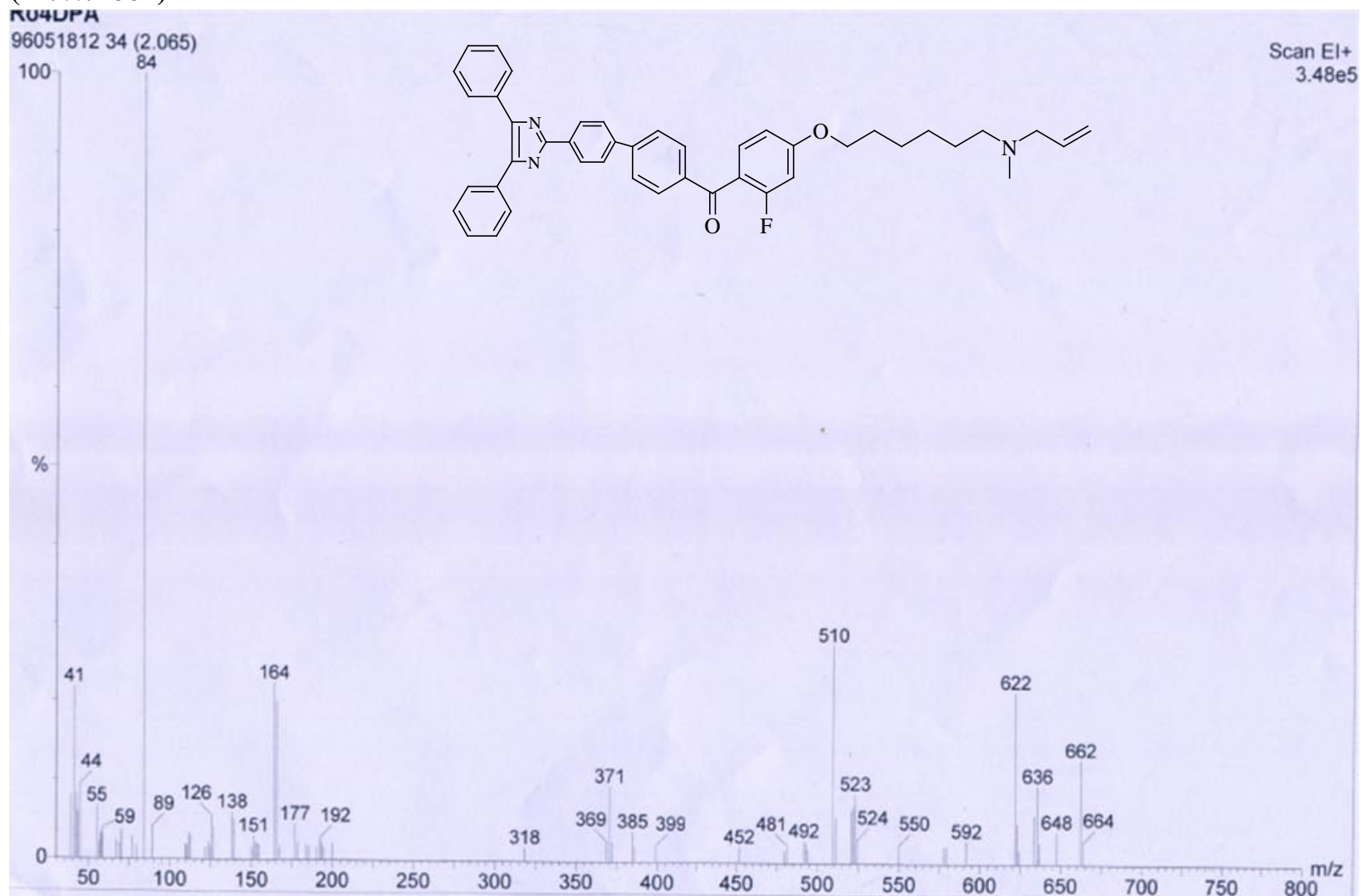




## 附錄二. Ro4-DPA 的 EI-MS 及 NMR 光譜分析

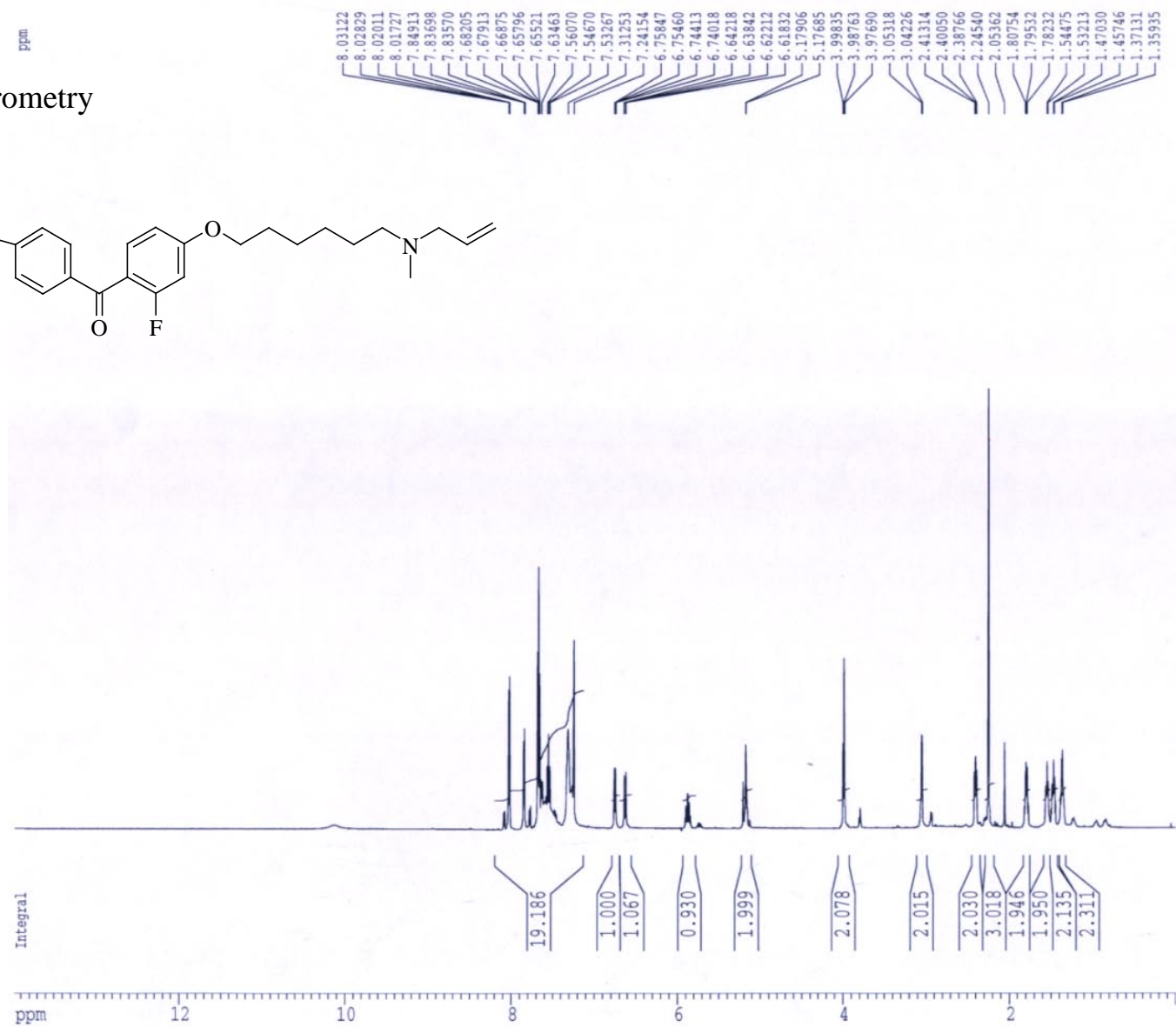
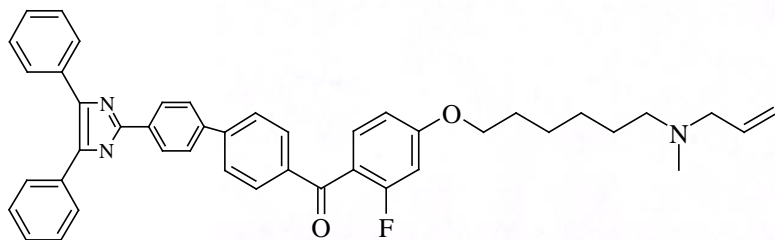
Ro4-DPA (M.W.=664)

EI-MS

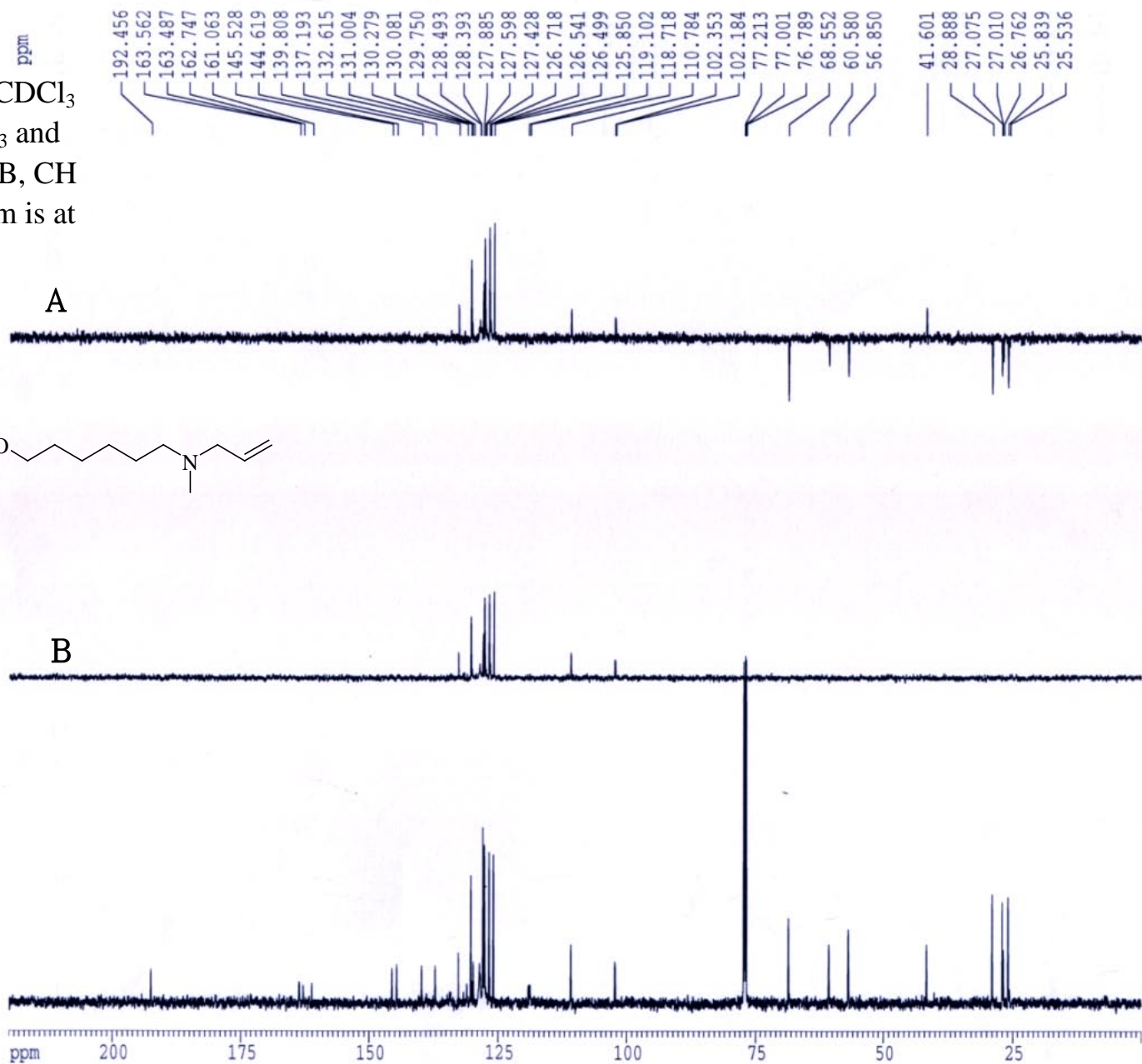
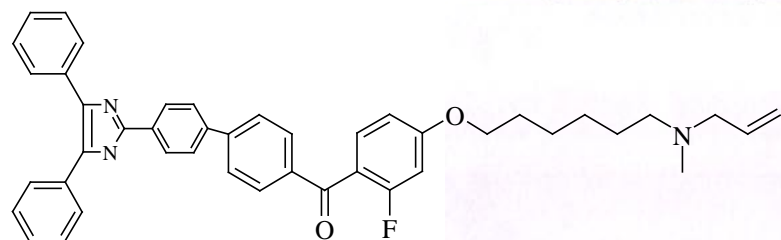


# Ro4-DPA

## <sup>1</sup>H NMR spectrometry



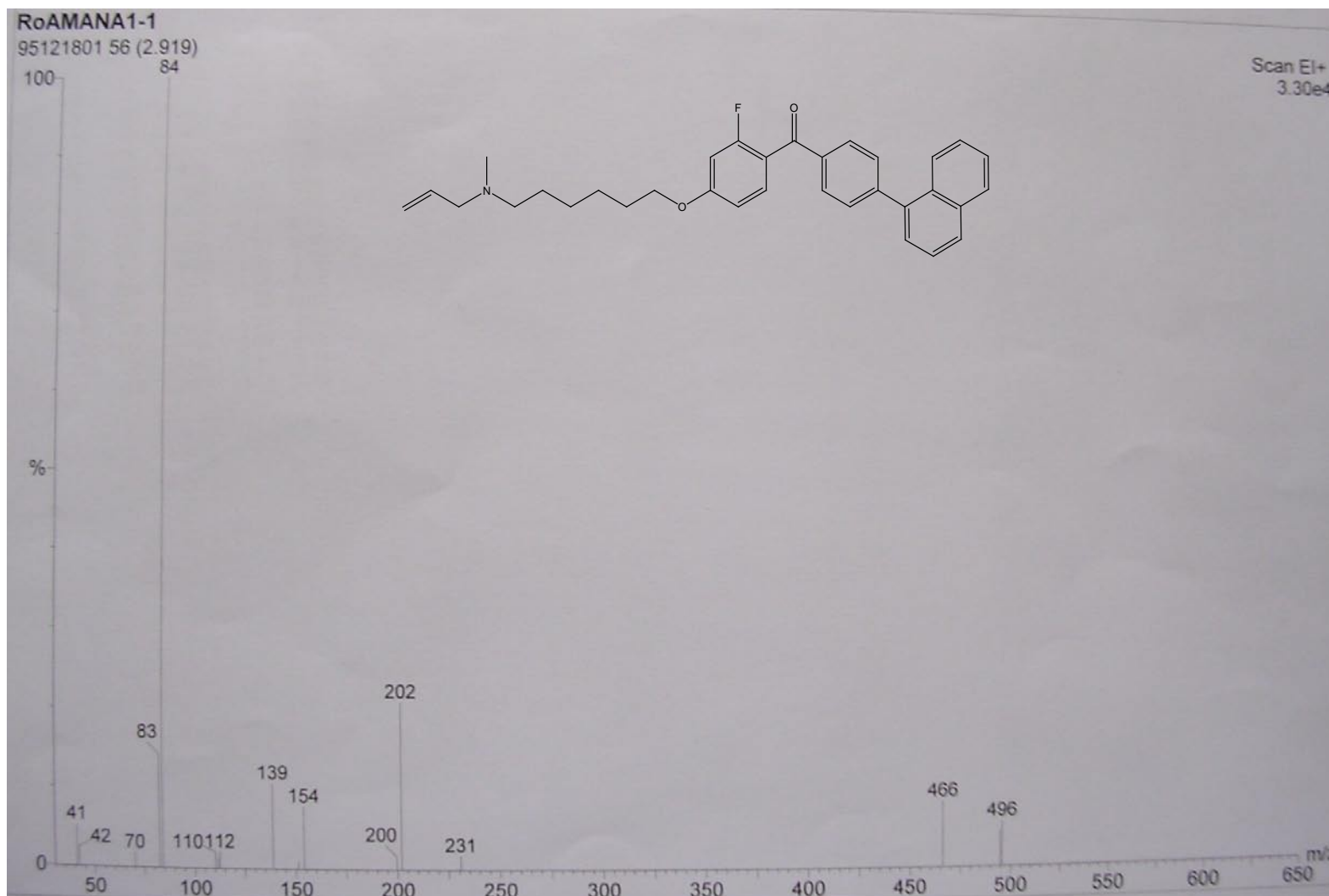
**DEPT** spectrum of **Ro4-DPA** in  $\text{CDCl}_3$  at 150 MHz. Subpectrum A,  $\text{CH}_3$  and  $\text{CH}$  up,  $\text{CH}_2$  down. Subpectrum B,  $\text{CH}$  up. The conventional  $^{13}\text{C}$  spectrum is at the bottom of the figure.



### 附錄三. Ro4-NA1、Ro4-NA2、Ro4-BP3、Ro4-BP4 的 EI-MS 及 NMR 光譜分析

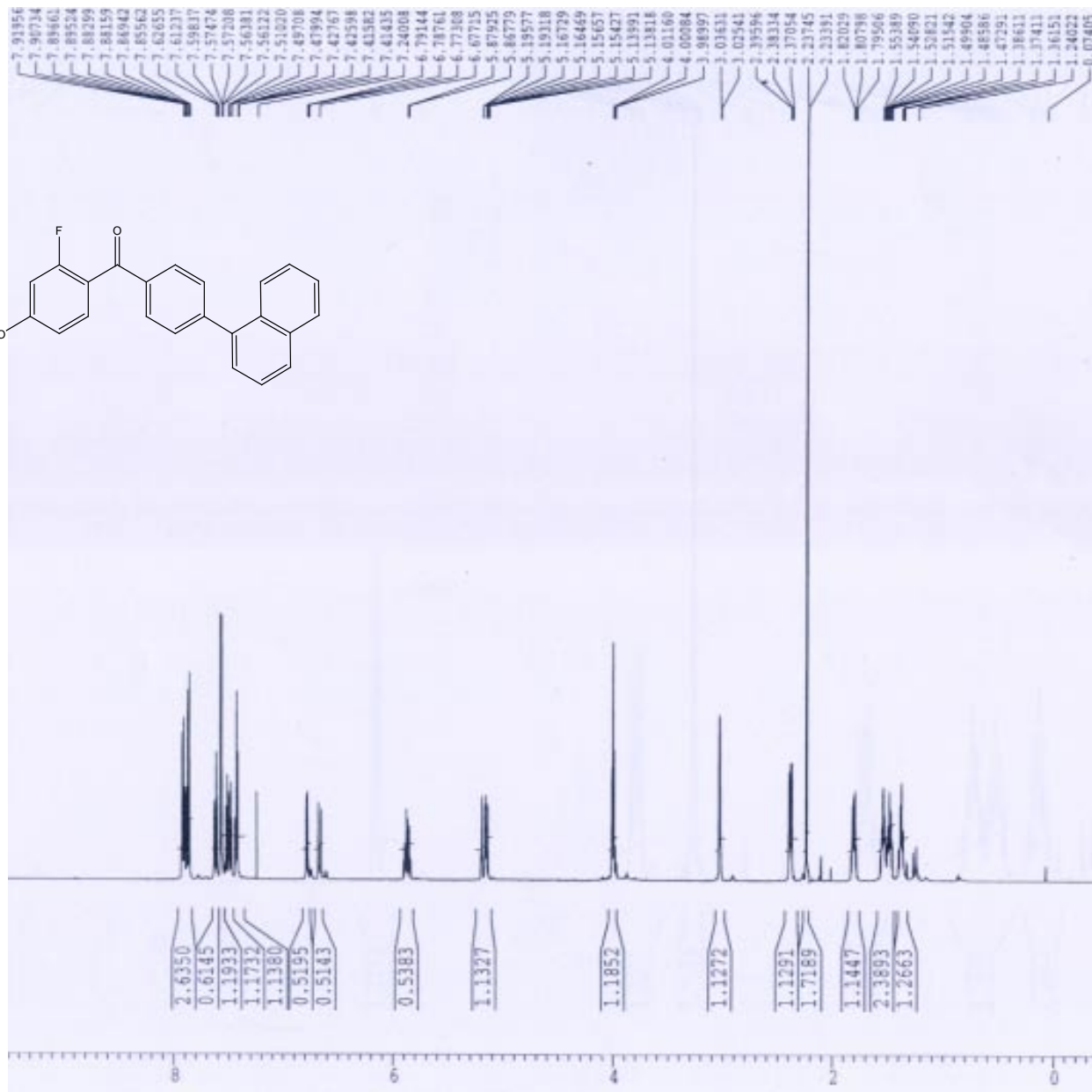
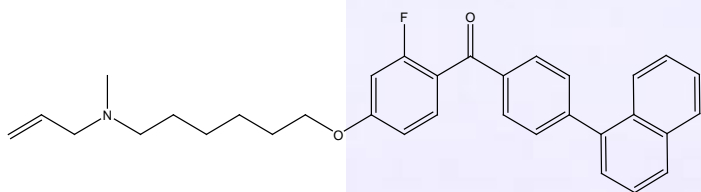
#### Ro4-NA1(M.W.=495)

EI-MS



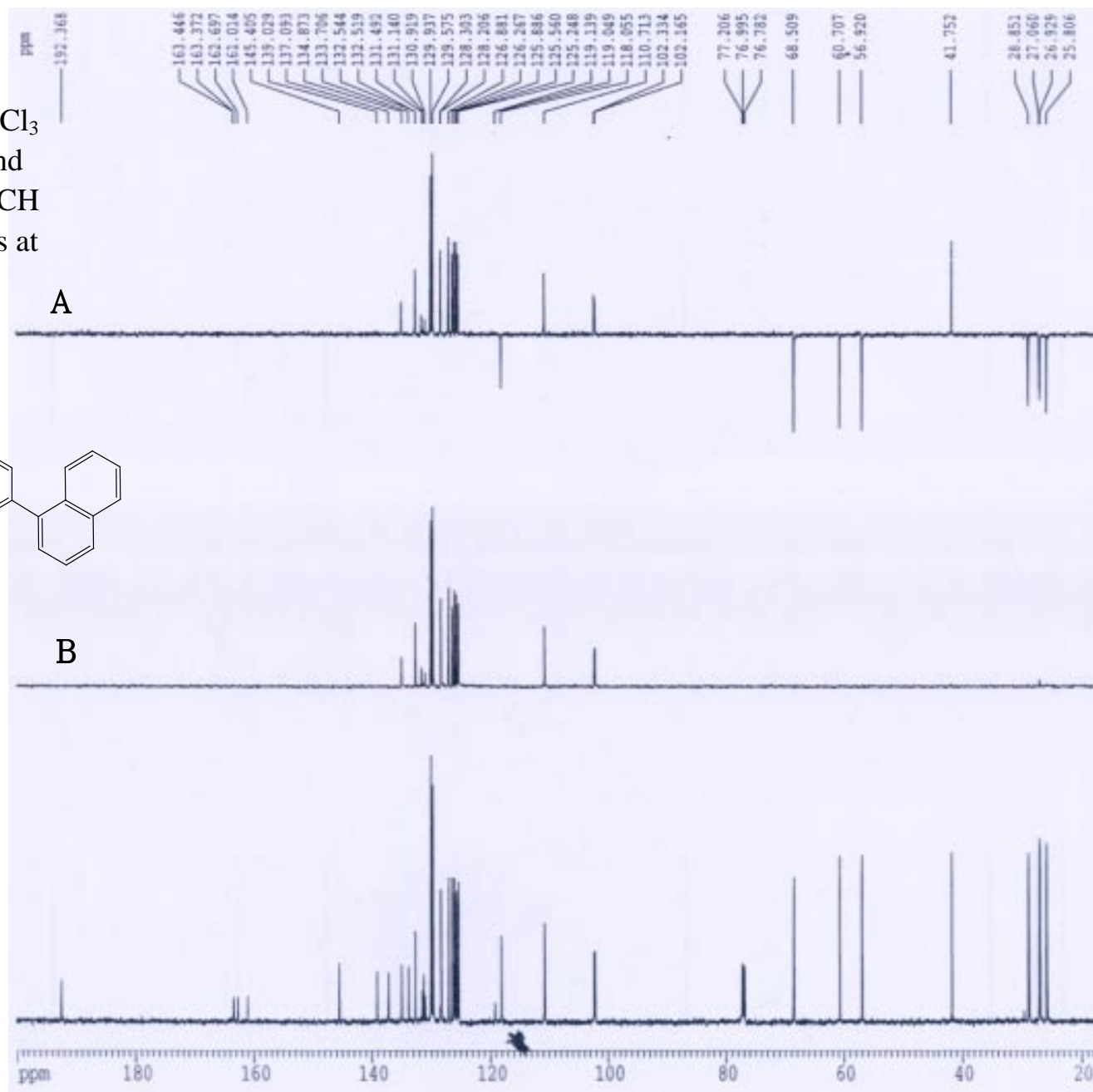
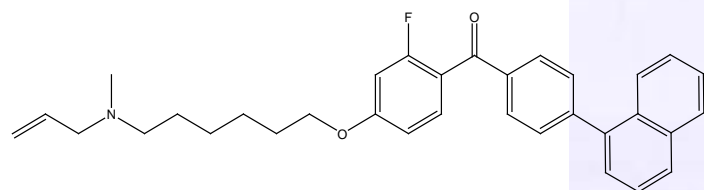
**Ro4-NA1**

<sup>1</sup>H NMR spectrometry



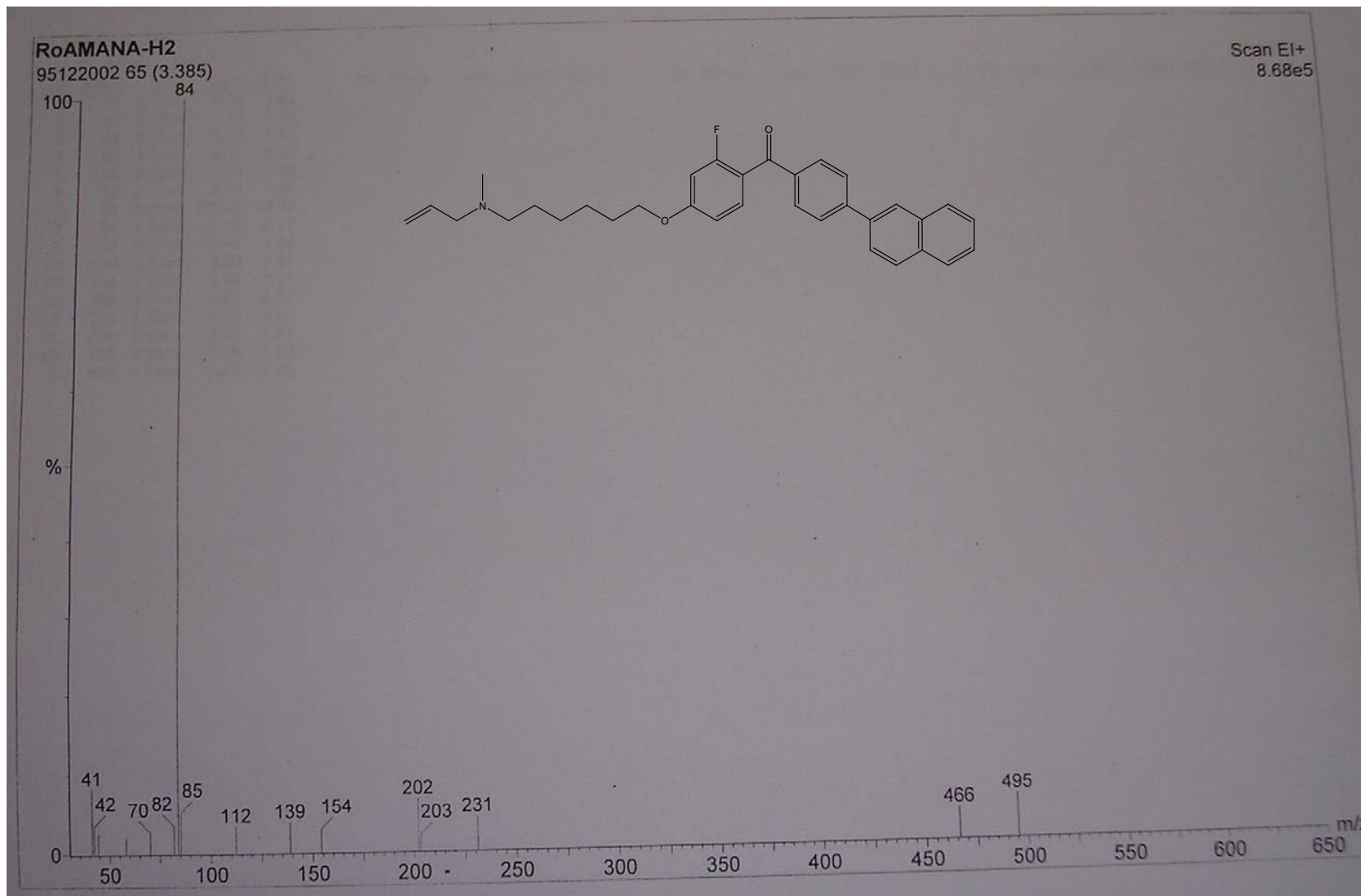


**DEPT** spectrum of **Ro4-NA1** in  $\text{CDCl}_3$  at 150 MHz. Subpectrum A,  $\text{CH}_3$  and  $\text{CH}$  up,  $\text{CH}_2$  down. Subpectrum B,  $\text{CH}$  up. The conventional  $^{13}\text{C}$  spectrum is at the bottom of the figure.



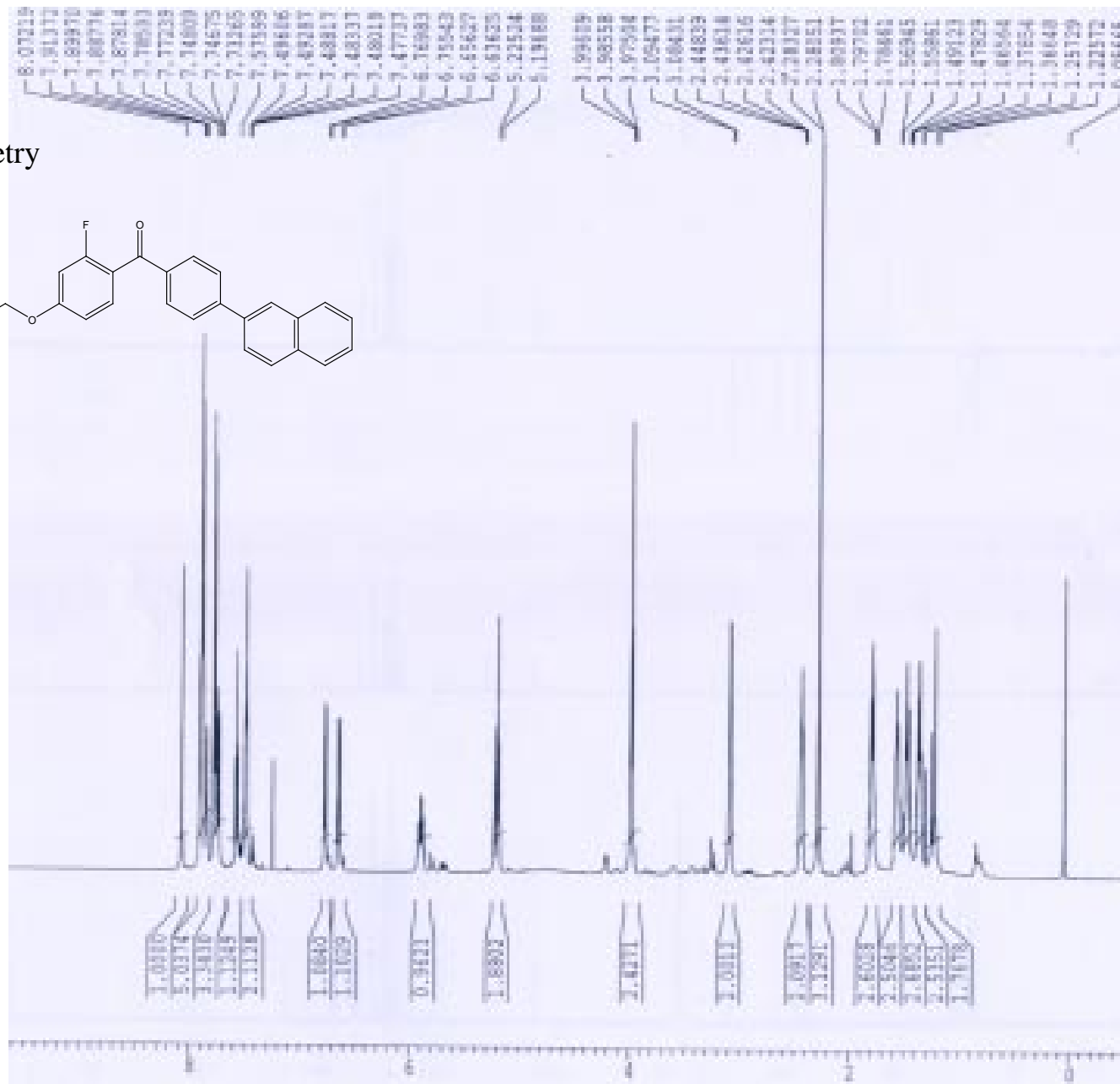
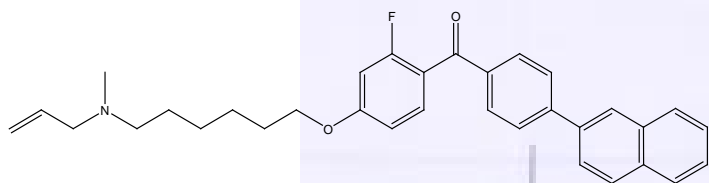
**Ro4-NA2 (M.W.=495)**

EI-MS

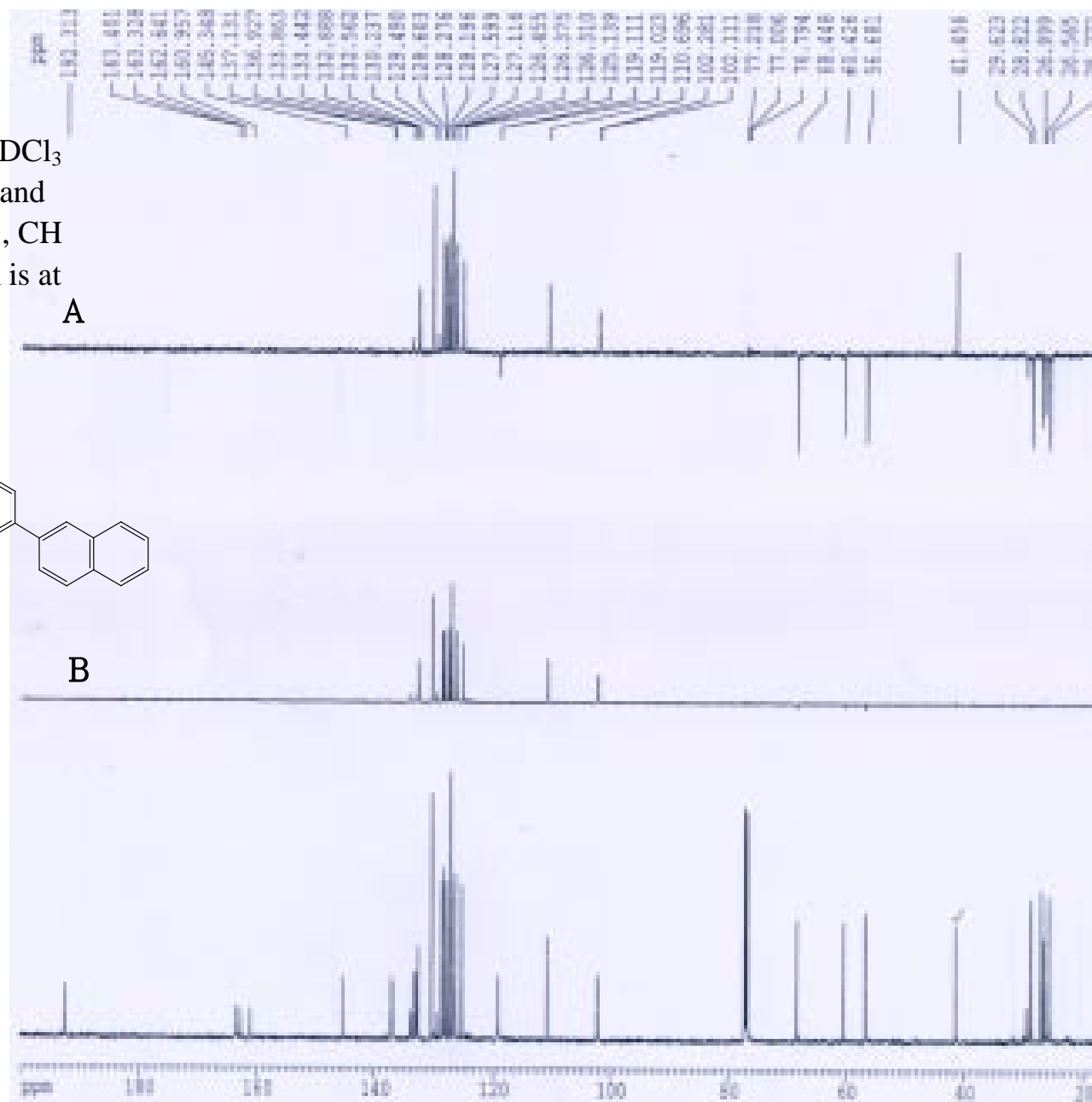
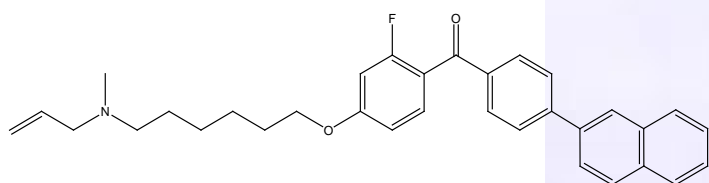


# Ro4-NA2

<sup>1</sup>H NMR spectrometry

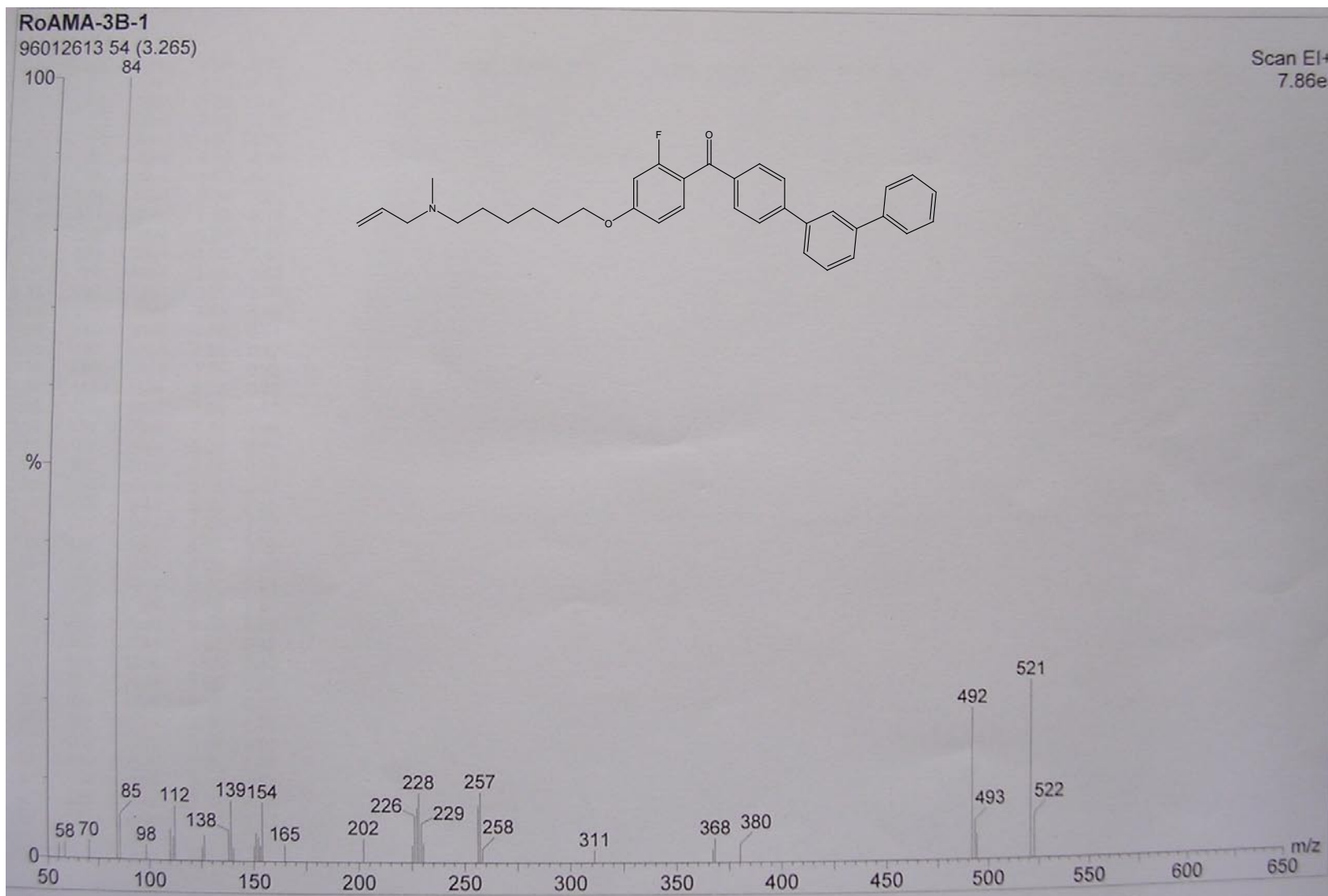


**DEPT** spectrum of **Ro4-NA2** in  $\text{CDCl}_3$  at 150 MHz. Subspectrum A,  $\text{CH}_3$  and  $\text{CH}$  up,  $\text{CH}_2$  down. Subspectrum B,  $\text{CH}$  up. The conventional  $^{13}\text{C}$  spectrum is at the bottom of the figure.



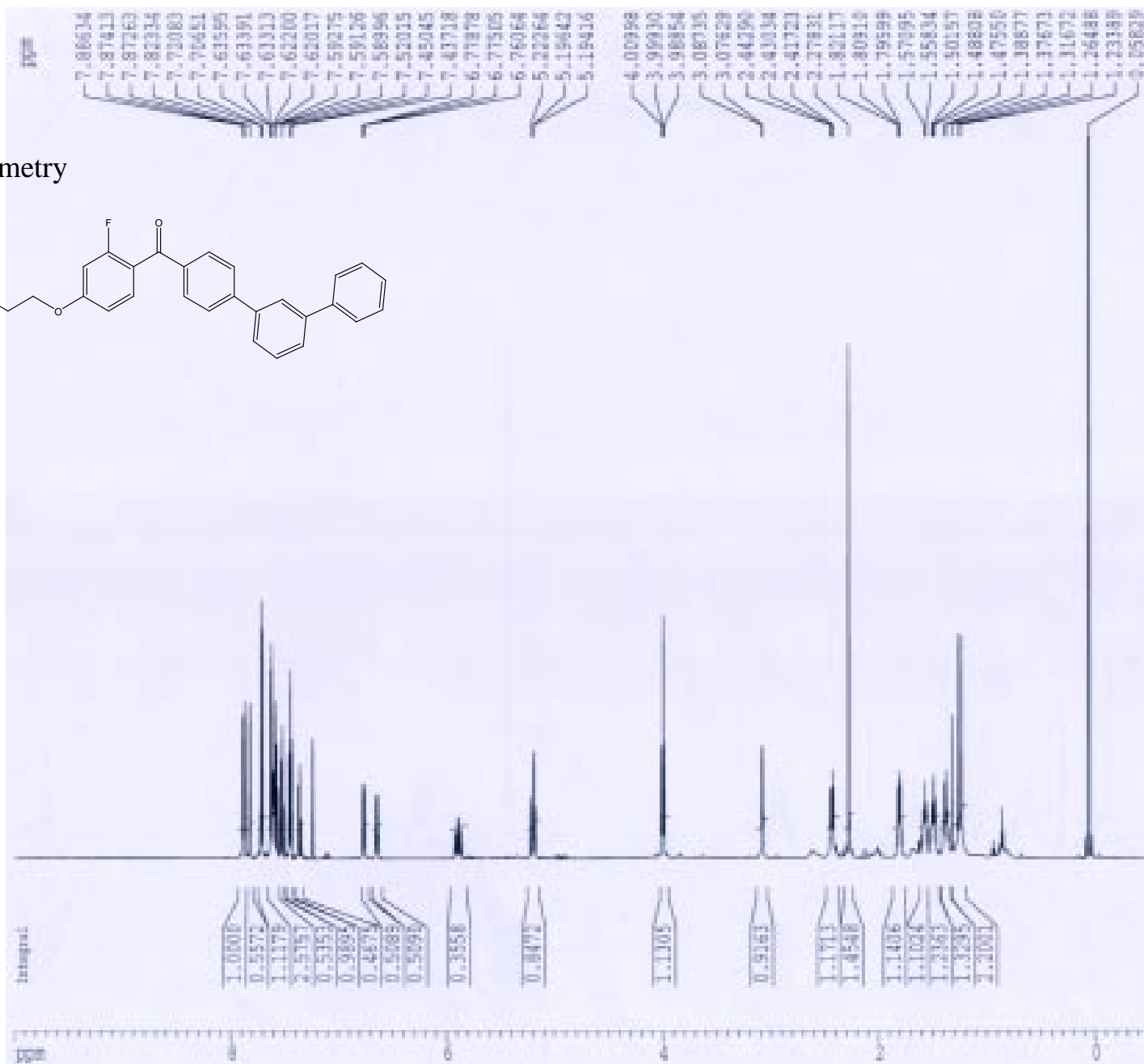
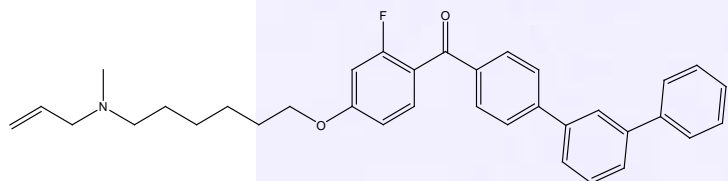
**Ro4-BP3 (M.W.=521)**

EI-MS



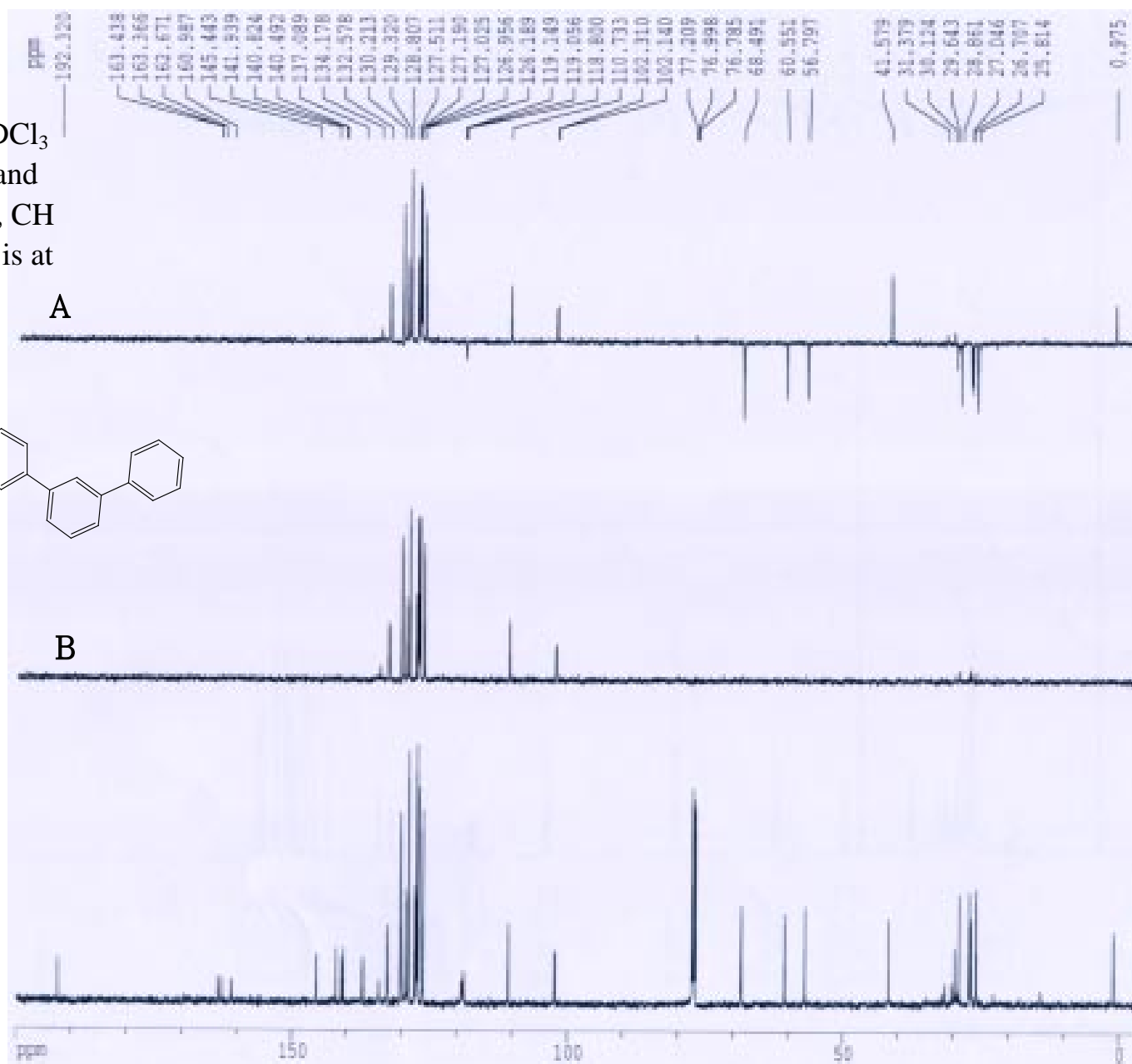
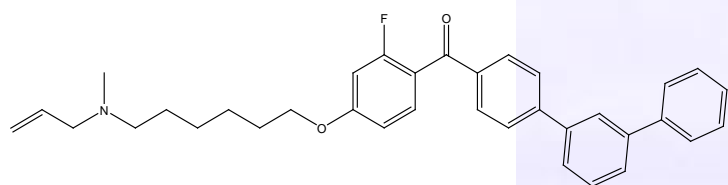
# Ro4-BP3

<sup>1</sup>H NMR spectrometry



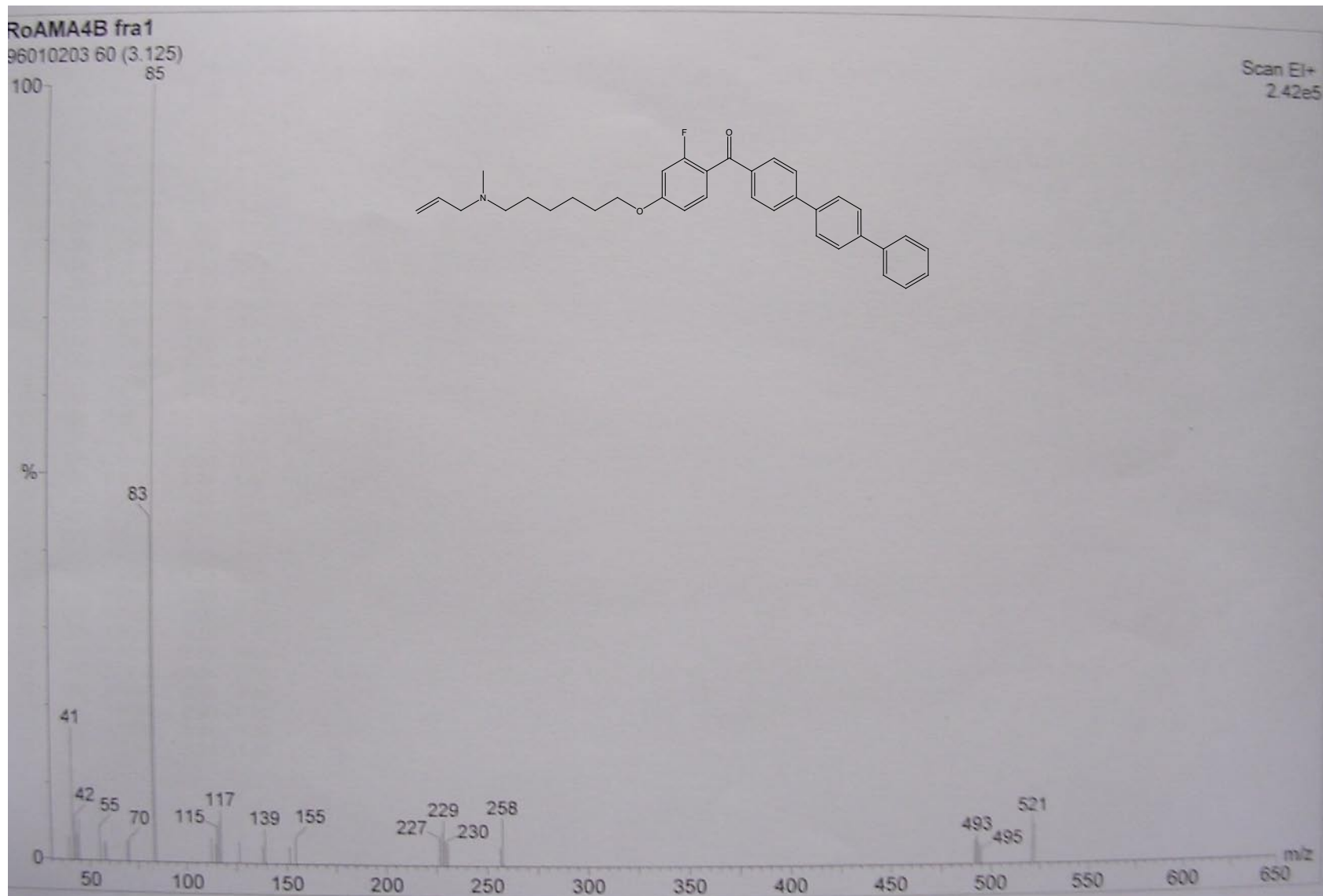


**DEPT** spectrum of **Ro4-BP3** in  $\text{CDCl}_3$  at 150 MHz. Subspectrum A,  $\text{CH}_3$  and  $\text{CH}$  up,  $\text{CH}_2$  down. Subspectrum B,  $\text{CH}$  up. The conventional  $^{13}\text{C}$  spectrum is at the bottom of the figure.



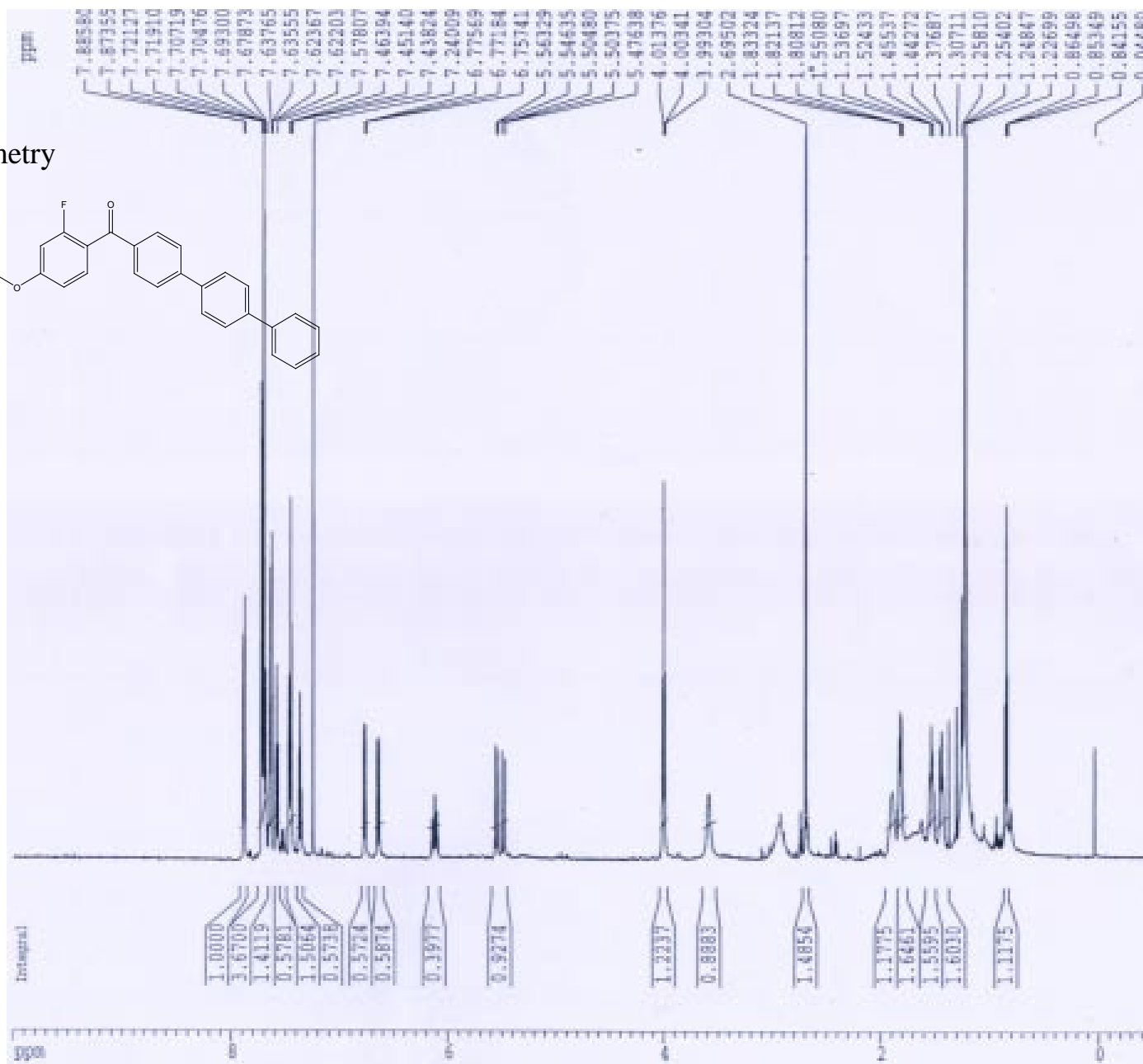
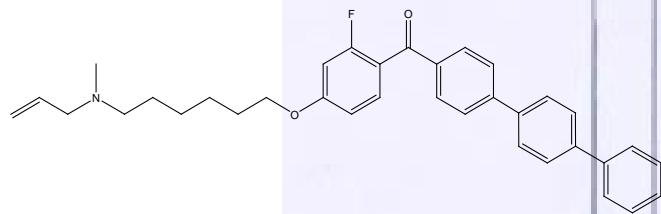
**Ro4-BP4(M.W.=521)**

EI-MS



# Ro4-BP4

<sup>1</sup>H NMR spectrometry



**DEPT** spectrum of **Ro4-BP4** in  $\text{CDCl}_3$  at 150 MHz. Subspectrum A,  $\text{CH}_3$  and  $\text{CH}$  up,  $\text{CH}_2$  down. Subspectrum B,  $\text{CH}$  up. The conventional  $^{13}\text{C}$  spectrum is at the bottom of the figure.

