

科技部補助專題研究計畫成果報告 期末報告

探討本土性黑殭菌(*Metarhizium anisopliae*)、月橘 (*Murraya paniculata* L. Jack.) 所含二次代謝物及其抗登革熱病毒之研究

計畫類別：個別型計畫
計畫編號：MOST 105-2320-B-276-002-
執行期間：105年08月01日至106年09月30日
執行單位：美和學校財團法人美和科技大學生物科技系

計畫主持人：林昀生
共同主持人：李景欽、劉上賓
計畫參與人員：碩士班研究生-兼任助理：張雅涵
碩士班研究生-兼任助理：李澔
大專生-兼任助理：陳祉兆
大專生-兼任助理：趙彥榆

報告附件：出席國際學術會議心得報告

中華民國 106 年 12 月 31 日

中文摘要：2015年，根據衛福部疾管署統計，台灣南部地區感染登革熱人數約4萬餘人，2百多人因此而死亡。目前在預防及治療登革熱策略上，除了2015年12月墨西哥與菲律賓核准上市四價登革熱疫苗(Dengvaxia)之外，並無特殊藥物治療，因此從菌類的二次代謝物篩選天然先導物，以微生物可大量培養之優點，並結合藥理作用、結構修飾、化學合成、臨床試驗，未來或許有機會針對此進行產品開發。為了找尋和發展新藥，本研究中，我們以抑制NS2B蛋白為生物活性篩選導向，預試驗中發現分離自可可椰子紅胸葉蟲Coconut Leaf Beetle(*Brontispa longissima*)之蟲生真菌，黑殭菌*M. anisopliae* var. *anisopliae* (MA-126)以液態發酵和米粒太空包固態發酵之乙酸乙酯與酒精粗萃取物作測試，在兩者粗萃物濃度為50 μ g/ml時，對NS2B蛋白分別具35%、10%的抑制率。進而以活性導向進行大量培養，從固態發酵中分離純化出Destruxin A、Destruxin E；從控制於PH=4的液態發酵中分離純化出Destruxin A、Destruxin A2。實驗中也發現控制於PH=12的液態發酵中，透過NMR的檢測，未發現黑殭菌素(Destruxins)之成分。在活性試驗中，針對人類肝癌細胞株Huh-7，以登革熱第二型(strain 16681)病毒感染2小時後移除病毒液，加入Destruxin A、Destruxin E、Destruxin A2進行抗病毒測試，發現其抑制病毒的能力分別於EC50=0.749 \pm 0.014、0.764 \pm 0.046、6.602 \pm 1.263，在濃度為1 μ M時，對輔因子蛋白NS2B分別具62%、61%、34%的抑制率。由於黑殭菌素的分子較大，在結構解析方面較為複雜，目前尚有4個未解析出的黑殭菌素，將繼續進行解析，並進而進行MTS assay kit測定各黑殭菌素之細胞毒性(CC50)、以即時定量反轉錄-聚合酶連鎖反應(Real time quantitative RT-PCR; RT-qPCR)及Western blotting分析病毒RNA複製及蛋白產量，進而透過電腦軟體模擬有效成分之化學結構與大分子標靶蛋白進行分子對接(Molecular Docking Method)，以研究其交互作用。

中文關鍵詞：登革熱、NS2B蛋白、黑殭菌素

英文摘要：In 2015, according to the Ministry of Health, Welfare CDC statistics, about 40,000 people infected with dengue in southern Taiwan, more than 200 people died. Currently in strategy on the prevention and treatment of dengue fever, in addition in December 2015, Mexico and the Philippines approved for sale tetravalent dengue vaccine (Dengvaxia), no special medical treatment. Therefore, the screening of natural lead compounds from fungi secondary metabolites. The advantages of microbial culture can be a large number, combined with pharmacological effects, structural modification, chemical synthesis, clinical trials, the future, will have the opportunity for product development. In order to develop new drugs, we have screening biological activity oriented to inhibit NS2B protein. Now we find: we isolated from Coconut Leaf Beetle (*Brontispa longissima*) of Entomogenous, the bacteria has been identified as (*M. anisopliae* var. *anisopliae*) (MA-126). When we are dealing

with ethyl acetate crude extract from the liquid fermentation and solid state fermentation for testing, in crude extracts concentration of $50 \mu\text{g} / \text{ml}$, respectively, for NS2B protein with 35% and 10% inhibition. Furthermore, Destruxin A and Destruxin E were isolated and purified from the solid state fermentation. Destruxin A and Destruxin A2 were isolated and purified from the liquid fermentation controlled at $\text{pH} = 4$. In the experiment, it was also found that the composition of Destruxins was not detected in liquid fermentations controlled at $\text{pH} = 12$ by NMR. In the activity test, the human hepatoma cell line Huh-7 was infected with dengue type 2 (strain 16681) virus for 2 hours and then the virus solution was removed. Anti-virus test was conducted by adding Destruxin A, Destruxin E and Destruxin A2, The virus capacities were respectively $\text{EC}_{50} = 0.749 \pm 0.014$, 0.764 ± 0.046 and 6.602 ± 1.263 , and the inhibitory rates of 62%, 61% and 34% of the cofactor protein NS2B at the concentration of $1 \mu\text{M}$, respectively. Destruxins because of the large molecules, structural analysis is more complicated. There are still four unresolved Destruxins, will continue to be analyzed. The cytotoxicity (CC_{50}) of each destruxins was determined by MTS assay kit. The viral RNA replication and protein yield were analyzed by Real-time quantitative RT-PCR (RT-qPCR) and Western blotting. The computer software simulates the chemical structure of the active principle and the Molecular Docking Method of the macromolecular target protein to study its interaction.

英文關鍵詞：Dengue, NS2B protein, Destruxins

科技部補助專題研究計畫成果報告

(期中進度報告/期末報告)

探討本土性黑殭菌(Metarhizium anisopliae)、月橘(Murraya paniculata L. Jack.)所含二次代謝物及其抗登革熱病毒之研究

102/08/01 ~ 103/07/31

計畫類別：個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：MOST 105-2320-B-276-002

執行期間：105年08月01日至106年12月31日

執行機構及系所：美和學校財團法人美和科技大學

計畫主持人：林昀生

共同主持人：李景欽、劉上賓

計畫參與人員：張雅涵、李濤、陳祉兆、趙彥榆

本計畫除繳交成果報告外，另含下列出國報告，共1份：

執行國際合作與移地研究心得報告

出席國際學術會議心得報告

期末報告處理方式：

1. 公開方式：

非列管計畫亦不具下列情形，立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權，一年二年後可公開查詢

2. 「本研究」是否已有嚴重損及公共利益之發現：否 是

3. 「本報告」是否建議提供政府單位施政參考 否 是，_____（請列舉提供之單位；本部不經審議，依勾選逕予轉送）

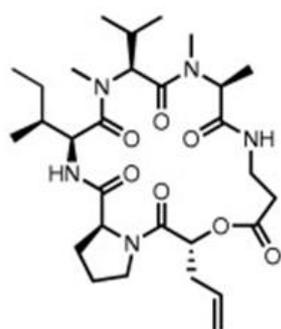
中 華 民 國 106 年 12 月 1 日

目 錄

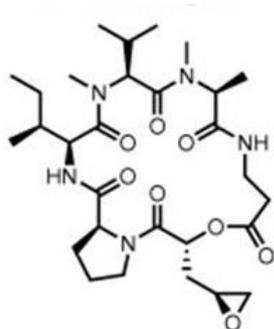
中文摘要	II
Abstract	III
第一章 研究背景與動機	
1.1 登革病毒細胞感染活性試驗結果	2
第二章 材料與方法	
2.1 供試菌株培養	4
2.2 液態培養量產	4
2.3 固態培養量產.....	5
2.4 萃取與分離.....	6
第三章 結果與討論	
3.1 Destruxin A 的 NMR 圖譜資料.....	8
3.2 Destruxin E 的 NMR 圖譜資料.....	12
3.3 Destruxin A2 的 NMR 圖譜資料.....	17
3.4 Epi-gonocarin A monoacetate (4) 的結構解析	21
第四章 活性測試	
4.1 Destruxins 對登革病毒細胞感染活性試驗結果.....	22
第五章 結論.....	22
參考文獻.....	24

中文摘要

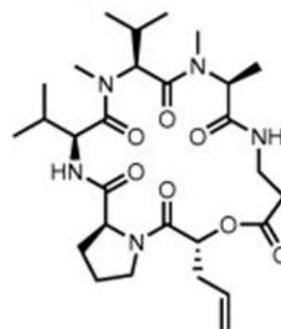
2015年，根據衛福部疾管署統計，台灣南部地區感染登革熱人數約4萬餘人，2百多人因此而死亡。目前在預防及治療登革熱策略上，除了2015年12月墨西哥與菲律賓核准上市四價登革熱疫苗(Dengvaxia)之外，並無特殊藥物治療，因此從菌類的二次代謝物篩選天然先導物，以微生物可大量培養之優點，並結合藥理作用、結構修飾、化學合成、臨床試驗，未來或許有機會針對此進行產品開發。為了找尋和發展新藥，本研究中，我們以抑制NS2B蛋白為生物活性篩選導向，預試驗中發現分離自可可椰子紅胸葉蟲Coconut Leaf Beetle(*Brontispa longissimi*)之蟲生真菌，黑殭菌*M. anisopliae var. anisopliae* (MA-126)以液態發酵和米粒太空包固態發酵之乙酸乙酯與酒精粗萃取物作測試，在兩者粗萃物濃度為50 μ g/ml時，對NS2B蛋白分別具35%、10%的抑制率。進而以活性導向進行大量培養，從固態發酵中分離純化出Destruxin A、Destruxin E；從控制於PH=4的液態發酵中分離純化出Destruxin A、Destruxin A2。實驗中也發現控制於PH=12的液態發酵中，透過NMR的檢測，未發現黑殭菌素(Destruxins)之成分。在活性試驗中，針對人類肝癌細胞株Huh-7，以登革熱第二型 (strain 16681) 病毒感染2小時後移除病毒液，加入Destruxin A、Destruxin E、Destruxin A2進行抗病毒測試，發現其抑制病毒的能力分別於 $EC_{50}=0.749 \pm 0.014$ 、 0.764 ± 0.046 、 6.602 ± 1.263 ，在濃度為1 μ M時，對輔因子蛋白NS2B分別具62%、61%、34%的抑制率。由於黑殭菌素的分子較大，在結構解析方面較為複雜，目前尚有4個未解析出的黑殭菌素，將繼續進行解析，並進而進行MTS assay kit測定各黑殭菌素之細胞毒性(CC₅₀)、以即時定量反轉錄-聚合酶連鎖反應 (Real time quantitative RT-PCR; RT-qPCR) 及Western blotting分析病毒RNA複製及蛋白產量，進而透過電腦軟體模擬有效成分之化學結構與大分子標靶蛋白進行分子對接(Molecular Docking Method)，以研究其交互作用。



Destruxin A



Destruxin E



Destruxin A2

關鍵詞：登革熱、NS2B 蛋白、黑殭菌素

Abstract

In 2015, according to the Ministry of Health, Welfare CDC statistics, about 40,000 people infected with dengue in southern Taiwan, more than 200 people died. Currently in strategy on the prevention and treatment of dengue fever, in addition in December 2015, Mexico and the Philippines approved for sale tetravalent dengue vaccine (Dengvaxia), no special medical treatment. Therefore, the screening of natural lead compounds from fungi secondary metabolites. The advantages of microbial culture can be a large number, combined with pharmacological effects, structural modification, chemical synthesis, clinical trials, the future, will have the opportunity for product development. In order to develop new drugs, we have screening biological activity oriented to inhibit NS2B protein. Now we find: we isolated from Coconut Leaf Beetle (*Brontispa longissimi*) of Entomogenous, the bacteria has been identified as (*M. anisopliae* var. *anisopliae*) (MA-126). When we are dealing with ethyl acetate crude extract from the liquid fermentation and solid state fermentation for testing, in crude extracts concentration of 50 $\mu\text{g} / \text{ml}$, respectively, for NS2B protein with 35% and 10% inhibition. Furthermore, Destruxin A and Destruxin E were isolated and purified from the solid state fermentation. Destruxin A and Destruxin A2 were isolated and purified from the liquid fermentation controlled at pH = 4. In the experiment, it was also found that the composition of Destruxins was not detected in liquid fermentations controlled at pH = 12 by NMR. In the activity test, the human hepatoma cell line Huh-7 was infected with dengue type 2 (strain 16681) virus for 2 hours and then the virus solution was removed. Anti-virus test was conducted by adding Destruxin A, Destruxin E and Destruxin A2, The virus capacities were respectively $\text{EC}_{50} = 0.749 \pm 0.014$, 0.764 ± 0.046 and 6.602 ± 1.263 , and the inhibitory rates of 62%, 61% and 34% of the cofactor protein NS2B at the concentration of 1 μM , respectively. Destruxins because of the large molecules, structural analysis is more complicated. There are still four unresolved Destruxins, will continue to be analyzed. The cytotoxicity (CC50) of each destruxins was determined by MTS assay kit. The viral RNA replication and protein yield were analyzed by Real-time quantitative RT-PCR (RT-qPCR) and Western blotting. The computer software simulates the chemical structure of the active principle and the Molecular Docking Method of the macromolecular target protein to study its interaction.

Key words : Dengue, NS2B protein, Destruxins

第一章 研究背景與動機

近十年來，登革熱(Dengue fever)為目前世界上廣為蔓延之疾病之一，發病率在全球大幅上升，根據世界衛生組織(WHO)統計，其好發地區，集中在熱帶、亞熱帶等有埃及斑蚊 (*Aedes aegypti*) 和白線斑蚊 (*Aedes albopictus*) 分布的國家，估計在128個國家中有25億人生活於疫區，處於感染登革熱病毒的風險，隨著國與國之間相互流通與往返頻繁，台灣病例由境外移入的趨勢也有明顯上升。估計全球每年約有5千萬~1億人遭受登革熱病毒感染，50萬人發展為登革熱出血熱，約有22000~25000人因而死亡。2015年，根據衛福部疾管局統計，台灣地區包含本土病例與境外移入病例，感染人數約4萬餘人，2百多人因此而死亡。目前在預防及治療登革熱策略上，除了2015年12月墨西哥與菲律賓核准上市四價登革熱疫苗(Dengvaxia)之外¹，本國並無核准任何疫苗與特殊藥物治療，因此從動、植物與菌類的二次代謝物篩選天然先導物，並結合藥理作用、結構修飾、化學合成、臨床試驗，開發治療抗登革熱藥物為刻不容緩之事。

登革熱病毒 (Dengue virus, DENV) 為造成登革熱之病原體，在分類上屬黃病毒科(Flaviviridae) 黃病毒屬(*Flavivirus*)。登革熱病毒依血清抗原型可分為四個血清型(DENV1、DENV2、DENV3及DENV4)，彼此間雖有部分抗原結構相同，但各型所激發的抗體對其他型的病毒而言，則無法提供寄主交叉保護的作用，因此一個人可能先後感染不同血清型的病毒²。臨床症狀可能為無症狀(asymptomatic)，或依其嚴重程度可區分為三種：登革熱 (dengue fever, DF)、登革出血熱 (dengue hemorrhagic fever, DHF) 以及登革休克症候群 (dengue shock syndrome, DSS)。登革熱病毒為球形，直徑約30~50 nm，內部是一個20面體的核殼，外圍則是雙層套膜，此套膜含脂質，而且嵌入外套蛋白和膜蛋白。核殼內的核酸含有一萬一千個核酸，為單股正相的核糖核酸 (RNA)，病毒內所含的核糖核酸具有感染性，且可直接轉譯成病毒所需的蛋白質。登革熱病毒必須在細胞質內進行複製，整個過程共可產生10種功能不同的蛋白質，其中殼蛋白 (Core protein)、前驅膜蛋白 (Precursor membrane protein)、外膜蛋白 (Envelope protein) 為組合病毒的結構蛋白，尤以外膜蛋白在病毒感染細胞及誘發抗體上，扮演相當重要的角色。其他如NS1、NS2A、NS2B、NS3、NS4A、NS4B及NS5則為非結構性蛋白，它們是病毒複製、轉錄及轉譯病毒蛋白過程中的功能蛋白(圖四)^{3,4}。非結構蛋白中，NS1 是大小為 45kDa的病毒糖蛋白，被發現會被病毒感染的哺乳類細胞所釋放，釋放出的 NS1 認為對病毒複製有所幫助^{5,6}；NS2A分子量為 22 kDa，透過NS2B - NS3剪切而成兩種型態: NS2A and NS2A α 。研究發現對 NS2A 進行突變，會影響具感染力的病毒生成⁷；NS2B 為 NS3 重要的輔助因子 (cofactor)，目前被認為是和病毒的蛋白質切割酵素NS3 有關聯；NS3為具多功能的蛋白，一方面為 serine protease，負責剪切病毒轉譯出的多蛋白鏈；同時 NS3也是核糖核酸解旋酶 (RNA helicase)以及核糖核酸磷酸酶 (RTPase)，參與病毒基因體複製過程^{8,9}。NS4A會促使宿主細胞膜重組，此重組對病毒複製有影響¹⁰，

目前被證實會干擾宿主細胞的干擾素(interferon, IFN)訊息傳導，減少宿主防衛機制¹¹。NS5 為核糖核酸依賴性核糖核酸聚合酶 (RNA-dependent RNA polymerase, RdRp)，負責合成病毒 RNA 基因體¹²，此外NS5也具有甲基轉移酶 (methyl transferase)功能，參與 RNA capping 過程¹³近年研究指出，NS3蛋白為一種多功能蛋白，具有絲氨酸蛋白酶結構域 (的NS3pro)，並為最重要的非結構蛋白之一。但是，NS3pro的活性取決於其輔助因子NS2B (47個氨基酸)的相互作用，以形成NS2B-NS3pro複合物，負責剪切病毒轉譯出的多蛋白鏈。登革熱病毒的蛋白水解過程是由宿主細胞之蛋白酶和病毒NS2B-NS3蛋白酶兩者來主導反應，因此在開發抗登革熱病毒的研究中，常以找尋NS2B/NS3 Protease Inhibitor，當作指標以篩選抑制蛋白酶藥物¹⁴。

黑殭菌所產生的二次代謝物為黑殭菌素(destruxins)，其結構為由5個胺基酸： β 丙氨酸(β -alanine)、丙氨酸 (alanine)、纈氨酸 (valine)、異白氨酸 (isoleucine)、脯氨酸 (proline)及 α -羥基酸 (α -hydroxyacid) 以胜胜鍵鍵結之大環結構 (cyclopeptide)，依其化學結構可區分為A、B、C、D、E、F 六大類，其中以黑殭菌素A、B、E(Destruxin A、B、E)較常見，它們具有相同的氨基酸序列，-DHAL-Pro-L-Ile-L-MeVal-L-MeAla-b-Ala-。目前為止已被分離鑑定出28種，且大部分由黑殭菌(*Metarhizium anisopliae*)產生。目前已知黑殭菌素包含Destruxin A、Destruxin A2、Destruxin B、Destruxin B2、DestruxinC、Destruxin D、Destruxin D2、Destruxin E、Destruxin E2、desmethyldestruxin B等相似結構的化合物被發現，由於支鏈官能基的不同，每種黑殭菌素都擁有著不同的生物活性。黑殭菌素目前除了應用於生物防治上，近年研究亦將黑殭菌素應用於醫藥方面之發展，根據過去研究指出，黑殭菌素有抗癌細胞增生、抗病毒活性，及對脊椎動物的免疫作用等¹⁵。黑殭菌素 B2 (Destruxin B2) 可抑制人類B型肝炎腫瘤細胞株 Hep3B 中表面抗原基因 (HbsAg)的表現，其 $IC_{50} = 1.5 \mu g/ml$ ¹⁶。黑殭菌素 B (Destruxin B)具有抑制人類大腸癌細胞株 HT-29 生長的功效。對於 HT-29 細胞株的細胞半抑制濃度 $IC_{50} = 2 \mu M$ 。在動物實驗結果中顯示，低劑量的黑殭菌素 B (Destruxin B) (0.6 mg/kg/day) 能夠抑制老鼠 (xenograft) 腫瘤生長。再以黑殭菌素 B 及臨床大腸癌用藥5-氟尿嘧啶(5-FU) 治療兩周後，發現caspase-3 蛋白皆可被活化¹⁷。本計畫主要將利用固態發酵與液態發酵方式，開發大量培養與萃取分離純化其黑殭菌素，並將其應用於抗登革熱病毒，初步測試結果，發現其粗萃物對登革熱病毒NS2BNS3pro蛋白酶具有抑制活性。此為第一次將黑殭菌素應用在開發登革熱病毒藥物研究。

1.1 登革病毒細胞感染活性試驗結果

液態培養後之乙酸乙酯和酒精之粗萃物(EX1)與固態培養後之乙酸乙酯和酒精之粗萃物(EX2)，以Huh-7 細胞貼附於24 孔盤(5×10^4 /well)，以0.2 MOI 之登革第二型(strain 16681) 病毒感染2 小時，移除病毒液後加入不同濃度的天然萃取物，

三天後收取細胞RNA 及蛋白質，分以即時定量反轉錄-聚合酶連鎖反應（Real time quantitative RT-PCR; RT-qPCR）及Western blotting 分析病毒RNA 複製及蛋白質產量，藉此計算抑制病毒之EC₅₀。

MA-126 (Liquid culture)----- EX1
 MA-126 (Solid culture)----- EX2

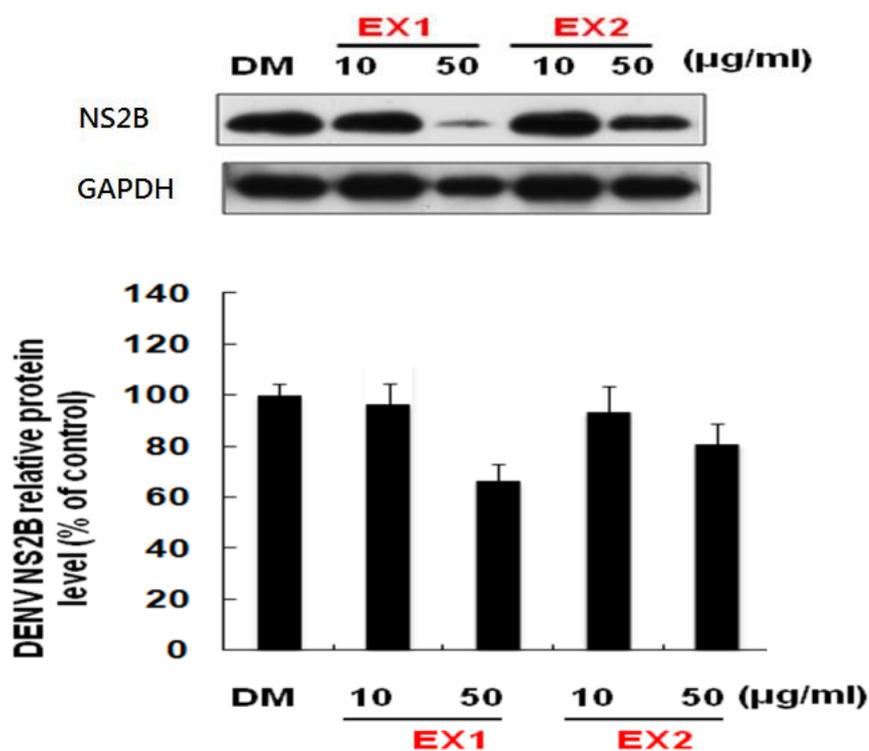


圖 1-1、萃提取物 (EX1) 、(EX1) 對 DENV NS2B 蛋白抑制試驗

該萃提取物 (EX1) 對細胞無毒殺性進行細胞毒性試驗；分析該萃提取物對於 Huh-7 細胞是否具毒性，先分別以不同濃度進行給藥處理培養 48 小時後，再以 MTT 進行 4 小時處理，最後加入 DMSO 震盪 5 分鐘後於 ELISA 以吸光值 540 nm 進行測定。結果如圖所示，可以發現該萃提取物對於 Huh-7 細胞無毒殺效果。

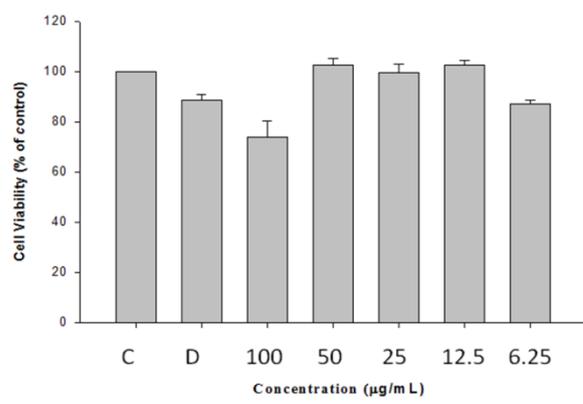


圖 1-2、萃提取物 (EX1) 對於 Huh-7 細胞之毒性試驗

第二章 材料與方法

2.1 供試菌株培養

從供試菌株黑殭菌*M. anisopliae* var. *anisopliae* (MA-126)，以Sabouraud dextrose agar(peptone from meat 5 g; peptone from casein 5 g; D(+)-glucose 40 g; agar 15 g/L；以下簡稱SDA)作為培養基接種，放置於28°C、8 hr 光照16 hr 黑暗處理(8 L：16D)之培養室，待其一週後長出菌絲及孢子，再重複進行繼代培養，供菌種孢子來源。



圖2-1、*M. anisopliae* var. *anisopliae* (MA-126)

2.2 液態培養量產：

以打孔器取一8mm MA-126 菌塊接種入已滅菌SDB(Sabouraud Dextrose Broth)培養液1L 中培養震盪，(本次試驗製作5 瓶共5L)，放置於28°C、8 hr 光照16 hr 黑暗處理(8 L：16D)之培養室，待其七天後長出菌絲。



圖2-2、大量培養前製作母液



圖2-3、大量培養時，控制發酵液PH=4，進行發酵



圖2-4、大量培養時，控制發酵液PH=9，進行發酵

2.3 固態培養情形

固態培養:米粒太空包量產

以打孔器取一8mm MA-126 菌塊接種入已滅菌SDB(Sabouraud Dextrose Broth)培養液中培養震盪3-4 天後備用；利用白米為材料，將米粒浸泡約60 分鐘使其米粒含水量平均達35%為最佳培養黑殭菌之條件，以300g/包裝至太空包中(本試驗製作10包)，經高壓滅菌釜滅菌(壓力15 磅 / 平方英吋，溫度121°C)溫度20 分鐘滅菌後，待降溫即可將108 conidia/ml 孢子懸浮液3%(v/v)為接種源菌液接種入滅菌之米太空包中15ml/包。於室溫培養 10~12 天後，經乾燥2~3 天，使其米粒含水量平均降至10%，以快速乾燥機可得到黑殭菌純孢子粉，再進行萃取。



圖 2-5、太空包培養黑殭菌之生長情形



圖 2-6、將孢子粉以乙酸乙酯和酒精進行萃取黑殭菌素

2.4 萃取與分離：

本預試驗分為液態培養與固態培養，

2.4.1 液態培養部分：

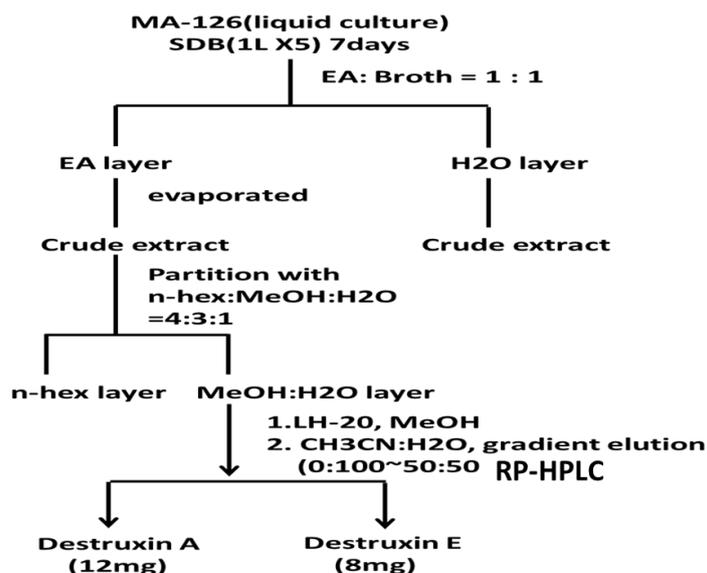
前培養：

以打孔器取一8mm MA-126 菌塊接種入已滅菌SDB(Sabouraud Dextrose Broth)培養液1L之三角錐形瓶中培養震盪，(製作5瓶共5L)，放置於28°C、8 hr光照16 hr 黑暗處理(8 L：16D)之培養室，進行培養7天後長出菌絲。

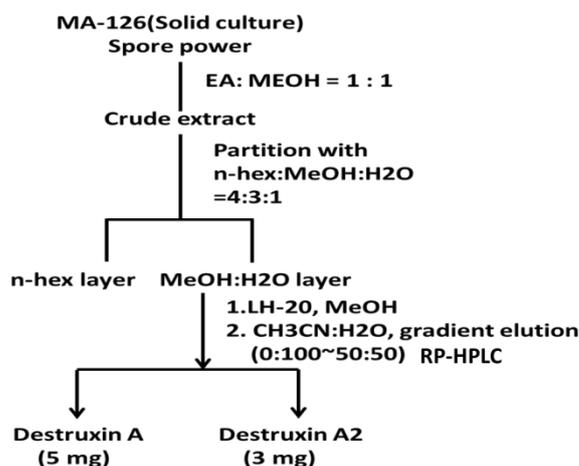
主培養：

發酵體積訂為10L。以培養條件150 rpm，28°C，0.3 vvm，pH=4 (1N HCl，2N NaOH來控制酸鹼值)、消泡劑(PE6100)。當所有培養條件穩定後，將前培養7天的黑殭菌以10%接菌量接種於發酵槽。待12天後，可見菌絲佈滿玻璃瓶內，將其用濾紙

過濾所得到之發酵液共10L，接著將過濾後的培養液去流填充高嶺土的管柱，將流下來的培養液，再利用乙酸乙酯1：1 的比例進行三次液液分配萃取，得到乙酸乙酯層和水層，爾後將乙酸乙酯層減壓濃縮後，得到粗萃物15.3(g)，再將此粗萃物以正己烷、甲醇及水為4：3：1，做第二次的液液分配萃取，得到甲醇水溶液層800 (mg)。經由 LH-20 管柱色層分析，以甲醇進行沖提後得到之分離層，再以高效能液相層析逆相管柱，以溶劑CH₃CN:H₂O進行梯度沖提 (0:100~50:50)，分離純化，經 NMR 圖譜鑑定後，得到Destruxin A(12 mg)、Destruxin E (8mg)。



2.4.2 固態培養部分: 於室溫培養12天後，使其米粒含水量平均降至約10%，以快速乾燥機得到黑殭菌純孢子粉，以乙酸乙酯:甲醇 = 1:1; 共1L 進行萃取3次，過濾後經減壓濃縮機濃縮後得到粗萃物15 (g)，再將此粗萃物以正己烷、甲醇及水為4：3：1，做第二次的液液分配萃取，得到甲醇水溶液層4 (g)。經由 LH-20 管柱色層分析，以甲醇進行沖提後得到之分離層，再以高效能液相層析逆相管柱，以溶劑CH₃CN:H₂O進行梯度沖提 (0:100~50:50)，分離純化，經 NMR 圖譜鑑定後，得到Destruxin A(5 mg)、Destruxin A2 (3 mg)。

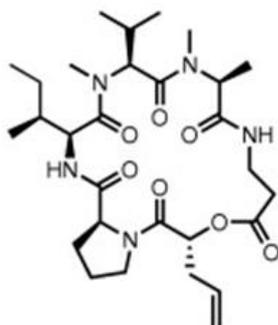


第三章 結果與討論

3.1 Destruxin A 的 NMR 圖譜資料

^1H NMR spectrum of Destruxin A recorded at 600MHz in CDCl_3 .

^{13}C NMR spectrum of Destruxin A recorded at 150MHz in CDCl_3 .



destruxin A

Position	δC	δH
1	53.6	4.88 dd
2	37.4	1.91 m
3	15.2	0.87 d
4	24.3	1.42 dq, 1.25 m
5	11.3	0.85 t
6	173.5	
7	29.1	3.21 s
8	58.0	4.95 d
9	27.2	2.32 m
10	19.6	0.93 d
11	20.0	0.89 d
12	171.0	
13	28.1	2.72 s
14	55.5	5.15 q
15	15.4	1.30 d
16	168.9	
17	33.2	4.04 m, 3.07 t
18	34.4	2.67 ddd, 2.49 dd
19	173.6	
20	72.7	4.84 dd
21	34.8	2.62 m, 2.57 m
22	131.3	5.80 m
23	119.5	5.20 qq, 5.15 m
24	169.7	
25	46.6	3.89 td, 3.48 m
26	24.0	1.94 m, 1.58 m
27	30.8	2.04 m, 1.65 m
28	60.7	4.66 d
29	170.9	

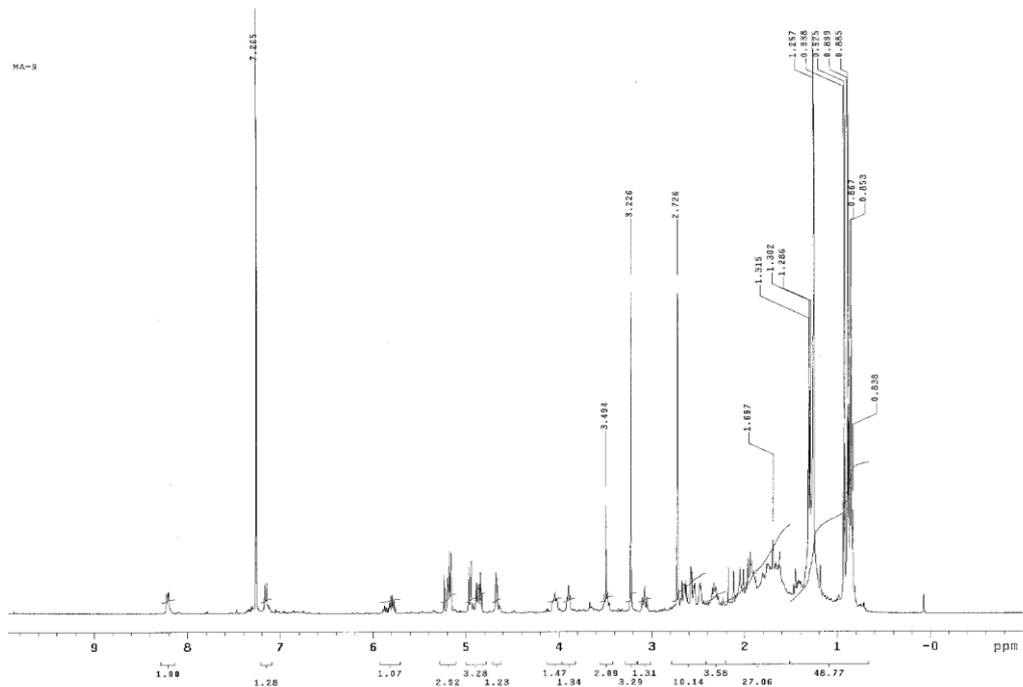


圖 3-1-1 、 Destruxin A 之 ^1H NMR 圖譜

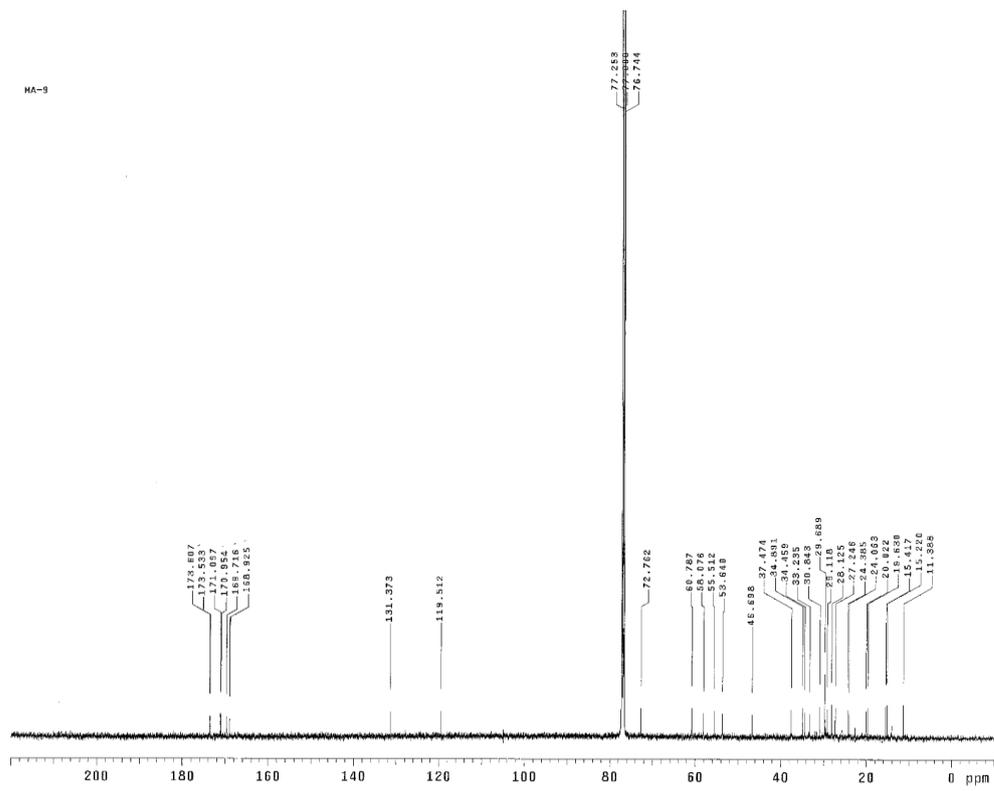


圖 3-1-2 、 Destruxin A 之 ^{13}C NMR 圖譜

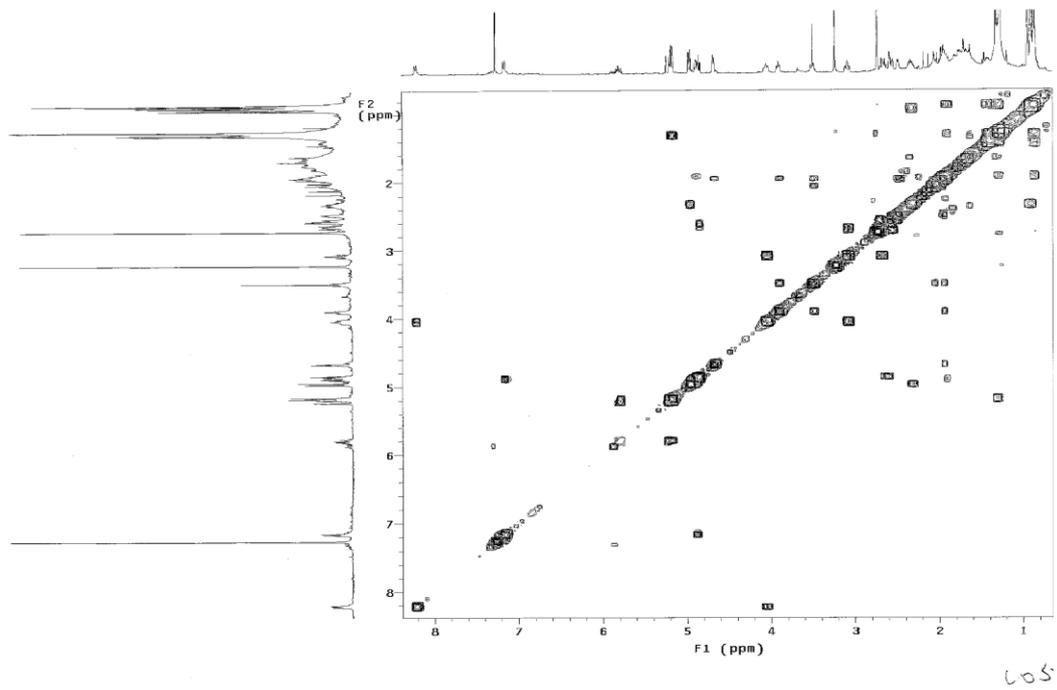


圖 3-1-3 、 Destruxin A 之 COSY 圖譜

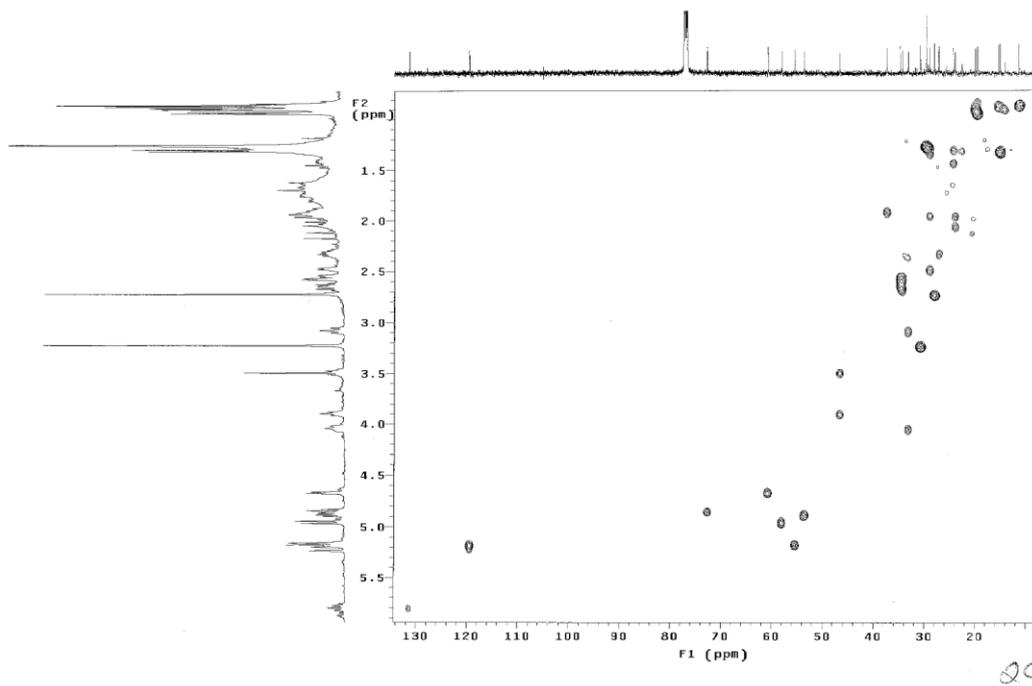


圖 3-1-4 、 Destruxin A 之 HMQC 圖譜

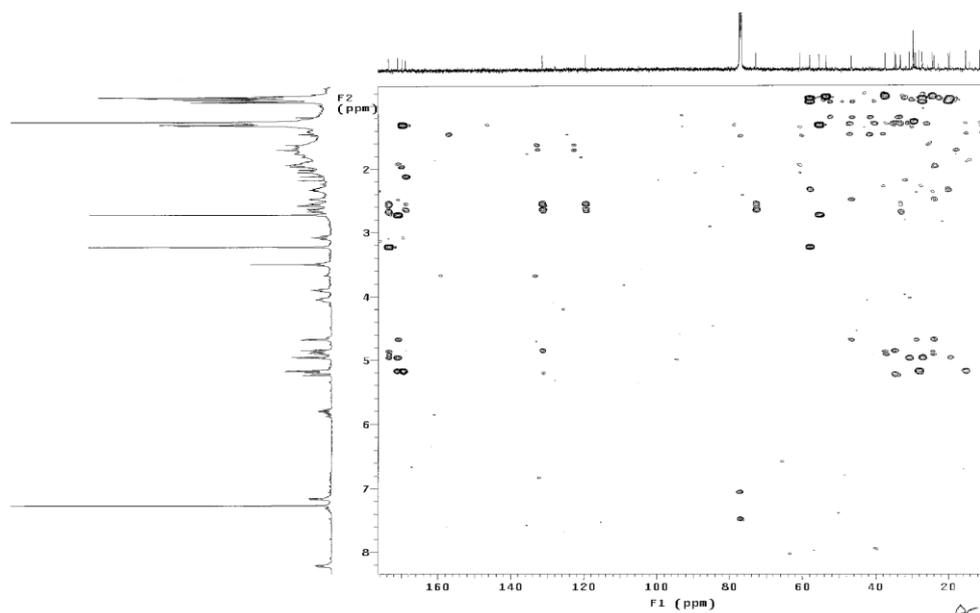


圖 3-1-5 、Destruxin A 之 HMBC 圖譜

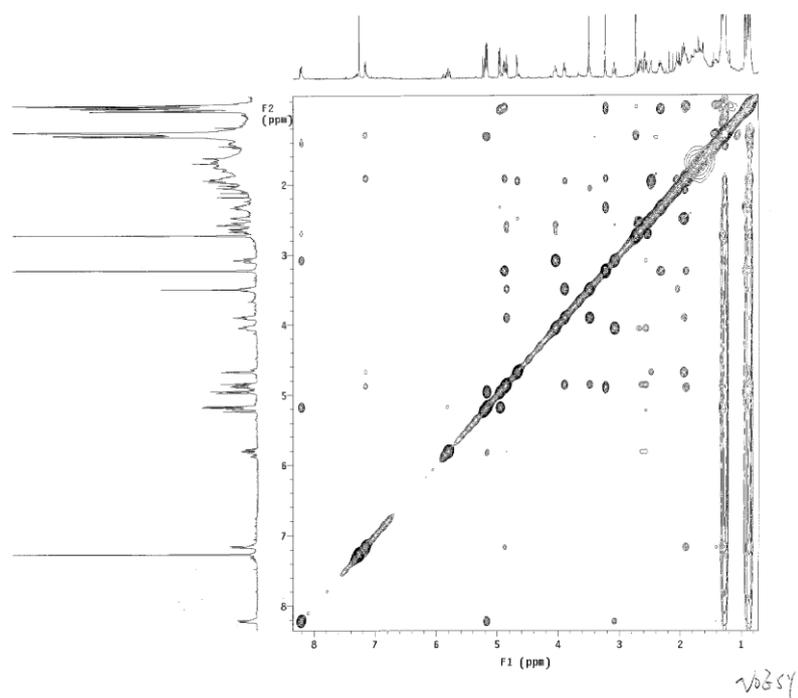
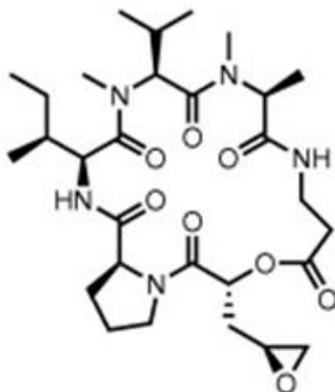


圖 3-1-6 、Destruxin A 之 NOESY 圖譜

3.2 Destruxin E 的 NMR 圖譜資料

^1H NMR spectrum of Destruxin E recorded at 600MHz in CDCl_3 .

^{13}C NMR spectrum of Destruxin E recorded at 150MHz in CDCl_3



Position	δC	δH
1	53.7	4.86 dd
2	37.4	1.84 m
3	15.2	0.85 d
4	24.3	1.43 m, 1.36 m
5	11.3	0.84 t
6	173.4	
7	29.1	3.21 s
8	58.0	4.93 d
9	27.2	2.31 m
10	19.5	0.87 d
11	20.0	0.92 d
12	171.0	
13	28.1	2.71 s
14	55.5	5.16 q
15	15.4	1.29 d
16	169.5	
17	33.1	4.04 m, 3.07 m
18	34.5	2.66 m, 2.56 m
19	173.6	
20	70.3	4.87 dd
21	34.9	1.93 m, 1.38 m
22	66.0	1.84 m
23	49.8	0.98 d
24	169.7	
25	46.6	3.87 td, 3.44 m
26	24.3	1.99 m, 1.58 m
27	30.9	2.01 m, 1.68 m
28	61.0	4.38 d
29	170.6	

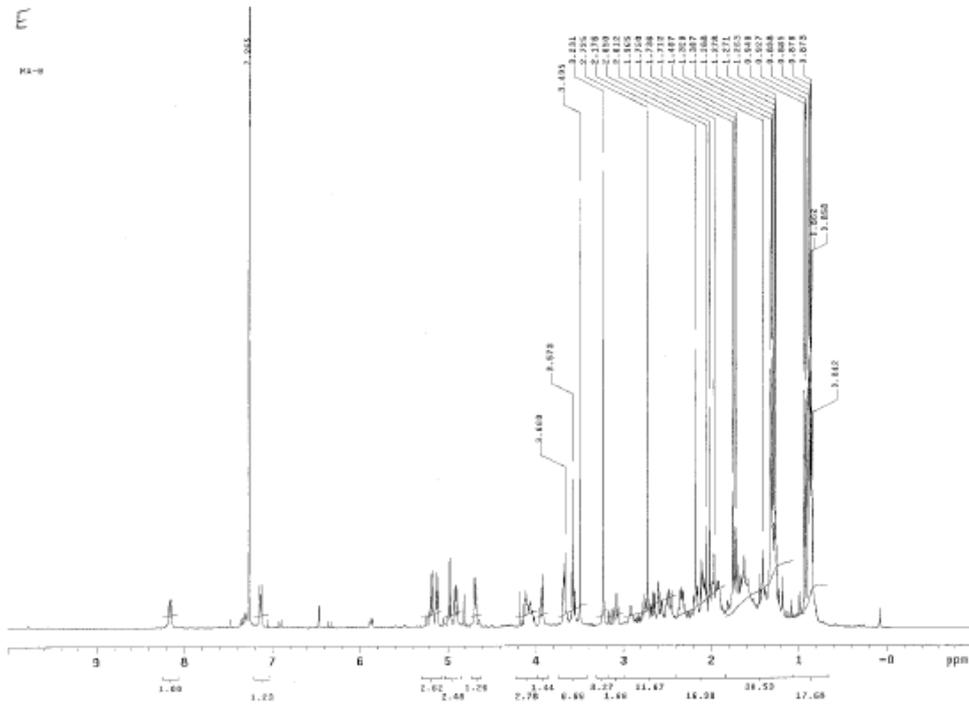


圖 3-2-1 、Destruxin E 之 ^1H NMR 圖譜

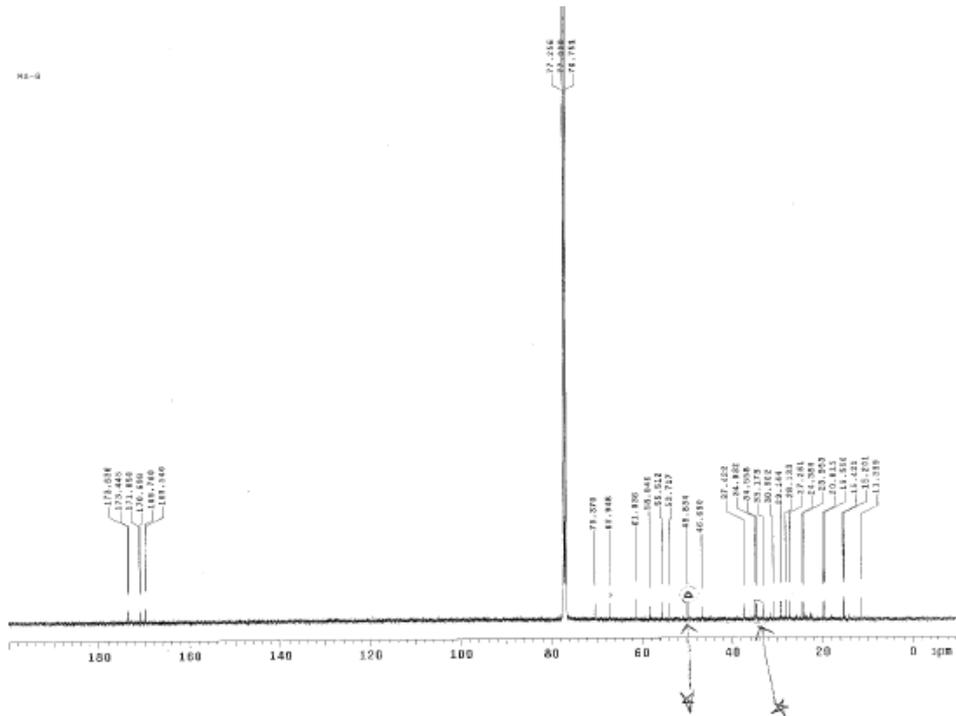


圖 3-2-2 、Destruxin E 之 ^{13}C NMR

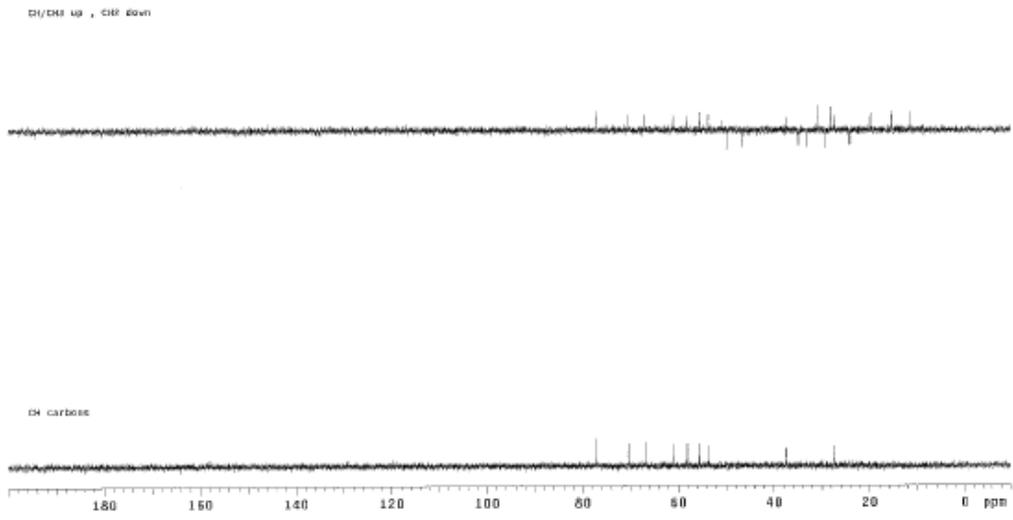


圖 3-2-3 、 Destruxin E DEPT 圖譜

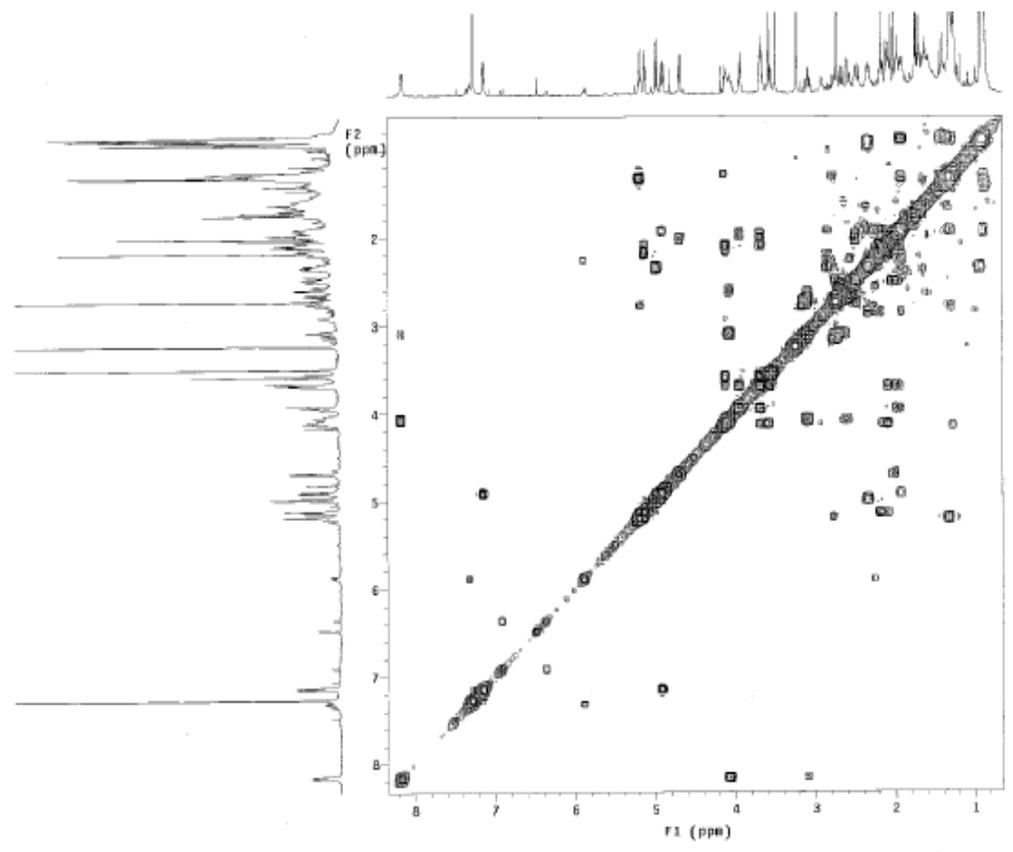


圖 3-2-4 、 Destruxin E 之 COSY 圖譜

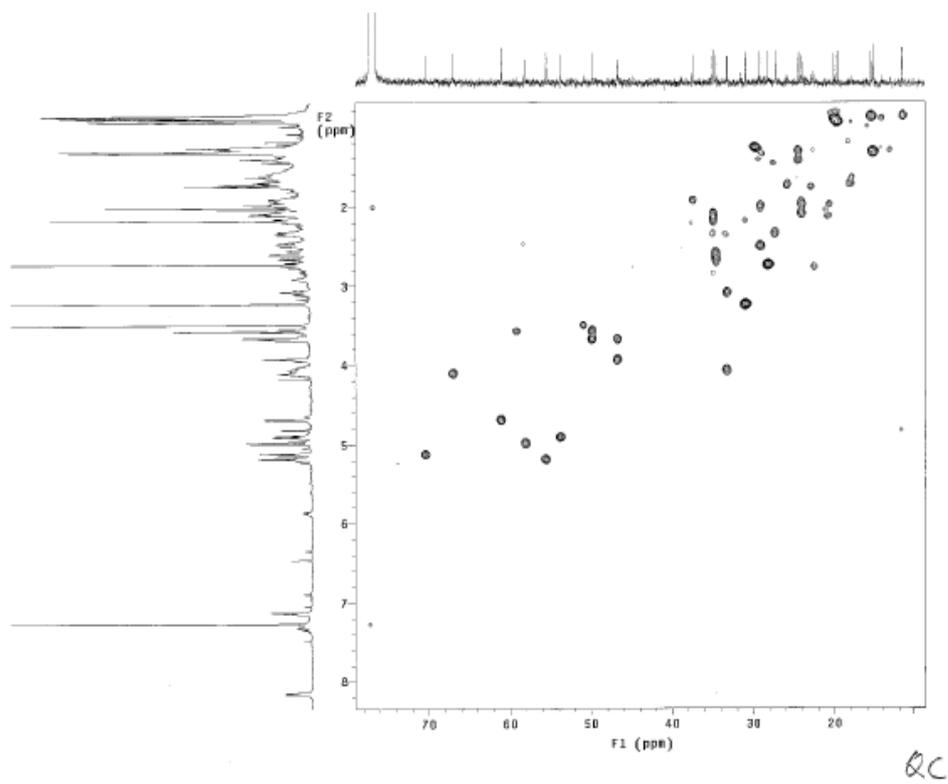


圖 3-2-5 、 Destruxin E 之 HMQC 圖譜

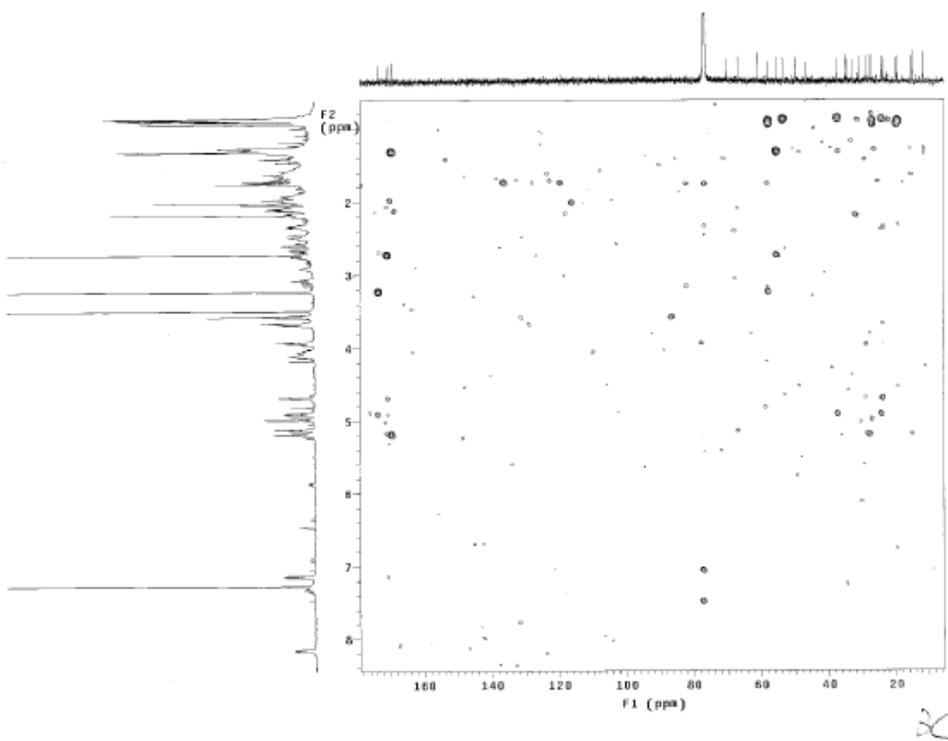


圖 3-2-6 、 Destruxin E 之 HMBC 圖譜

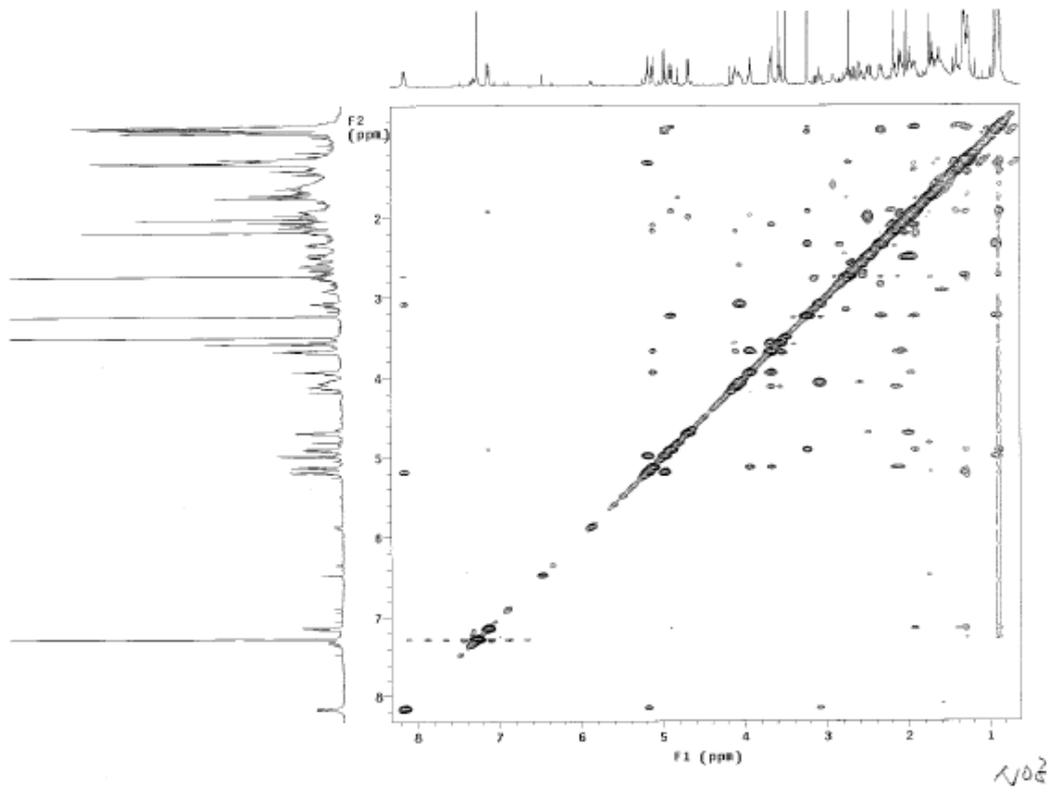
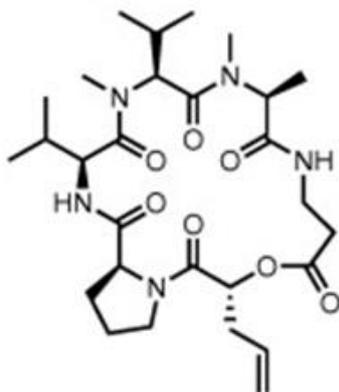


圖 3-2-6 、Destruxin E 之 NOESY 圖譜

3.3 Destruxin A2 的 NMR 圖譜資料

^1H NMR spectrum of Destruxin A2 recorded at 600MHz in CDCl_3 .

^{13}C NMR spectrum of Destruxin A2 recorded at 150MHz in CDCl_3 .



Destruxin A2

Position	δ_{C}	δ_{H}
1	53.6	4.84 dd
2	37.4	1.92 m
3	15.0	0.85 d
4	24.5	1.45 m, 1.28 m
5	11.7	0.86 t
6	173.4	
1-NH		7.70 d
7	30.7	3.22 s
8	58.4	4.96 d
9	27.36	2.32 dq
10	19.5	0.93 d
11	19.8	0.89 d
12	171.0	
13	28.5	2.73 s
14	55.8	5.17 q
15	15.2	1.31 d
16	169.6	
17	33.5	4.05 m, 3.08 m
18	34.0	2.68 m, 2.57 m
19	173.7	
17-NH		8.26 d
20	72.2	4.91 dd
21	39.0	1.96 ddd, 1.85 m
22	24.2	1.38 ddd
23	23.9	1.00 d
24	21.7	0.95 d
25	169.8	
26	44.9	3.86 dt, 3.57 dt
27	30.6	2.10 m, 1.70 m
28	35.7	2.79 m
29	19.2	1.11 d
30	65.2	4.27 d
31	170.8	

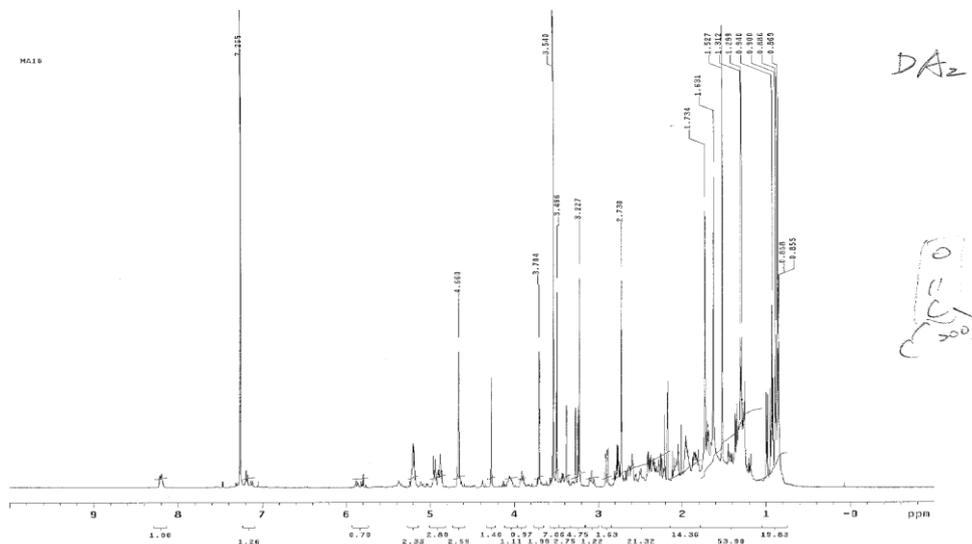


圖 3-3-1 、Destruxin A2 之 1H NMR 圖譜

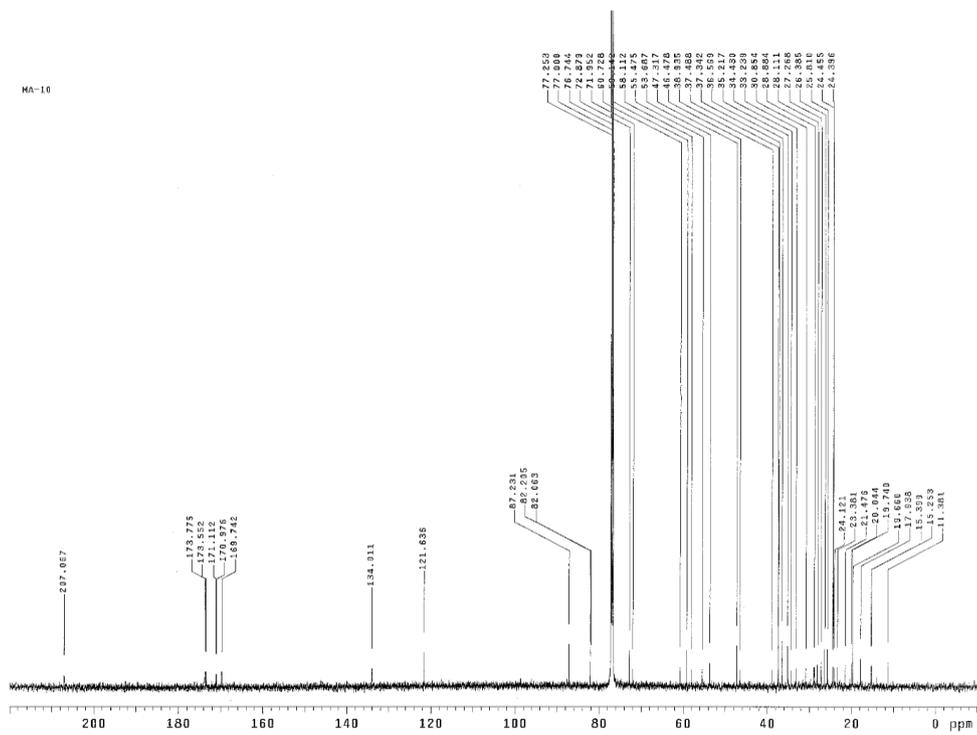


圖 3-3-2 、Destruxin A2 之 13C NMR

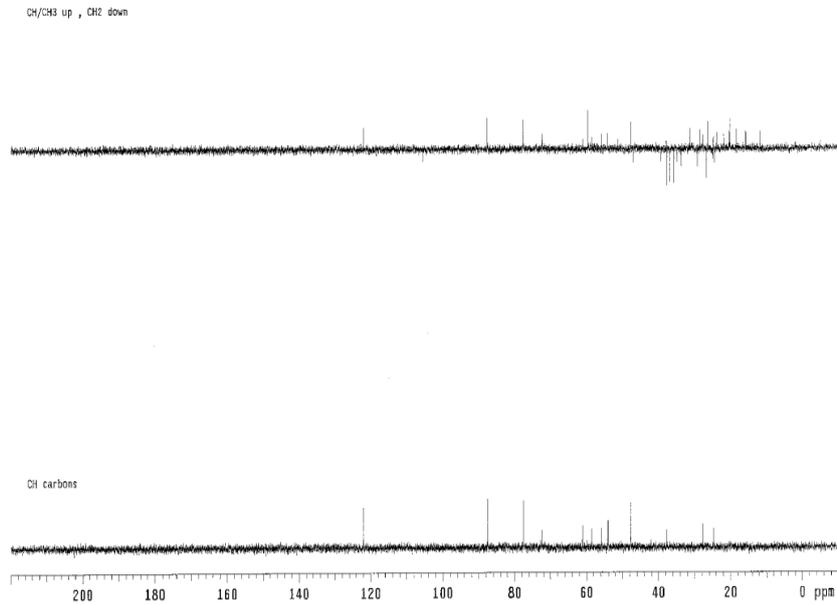


圖 3-3-3 、 Destruxin A2 DEPT 圖譜

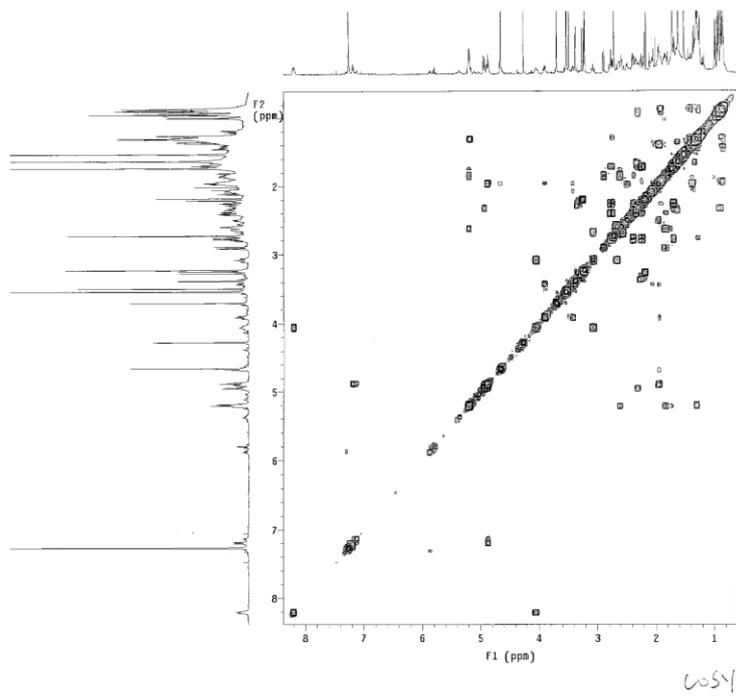
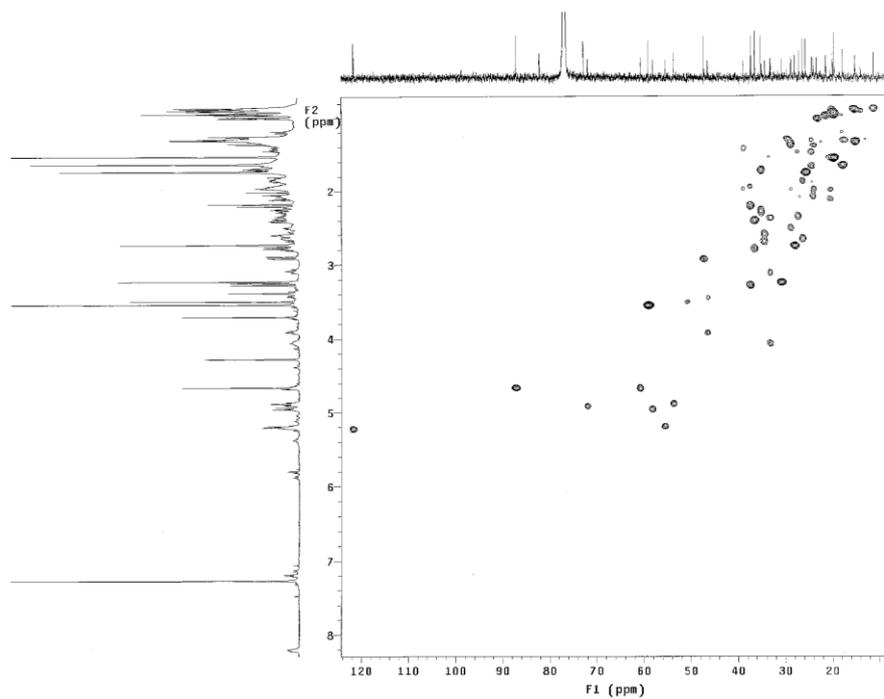
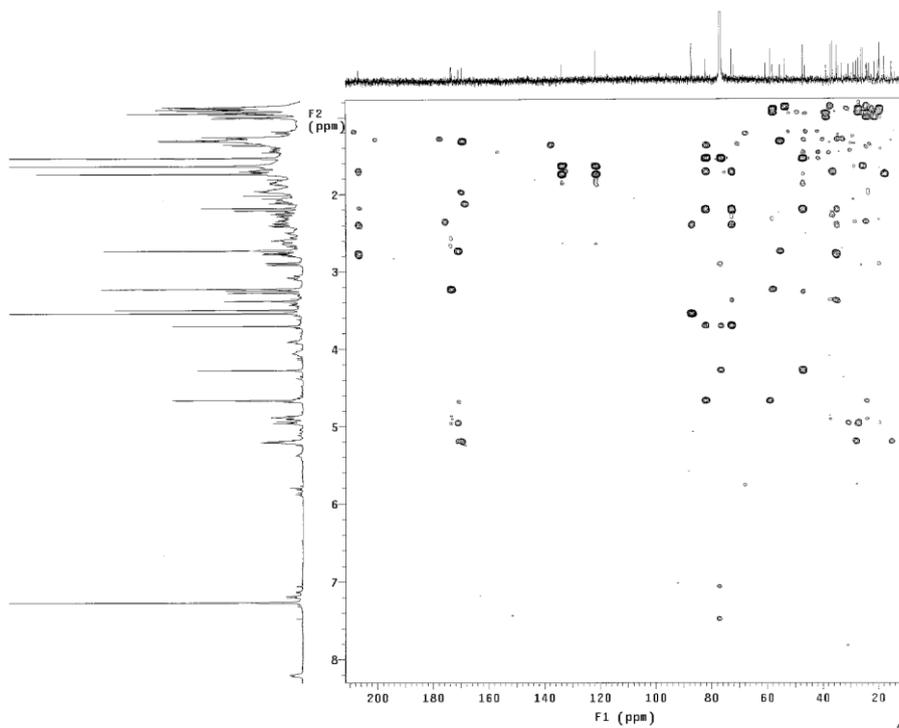


圖 3-3-4 、 Destruxin A2 之 COSY 圖譜



2C

圖 3-3-5 、 Destruxin A2 之 HMBC 圖譜



2C

圖 3-3-6 、 Destruxin A2 之 HMBC 圖譜

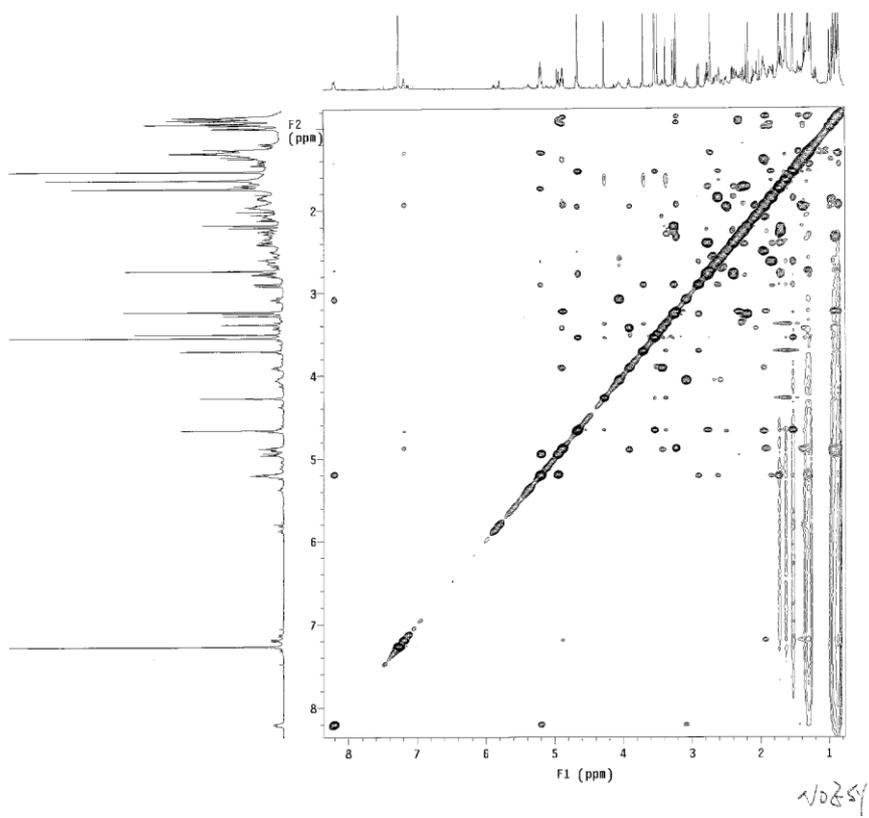


圖 3-3-6 、Destruxin A2 之 NOESY 圖譜

第四章 活性測試

4.1 登革病毒細胞感染活性預試驗結果

Huh-7 細胞貼附於24 孔盤(5×10^4 /well)，以0.2 MOI 之登革第二型(strain 16681) 病毒感染2 小時，移除病毒液後加入不同濃度的天然萃取出物，三天後收取細胞RNA 及蛋白質，分以即時定量反轉錄-聚合酶連鎖反應 (Real time quantitative RT-PCR; RT-qPCR) 及Western blotting 分析病毒RNA 複製及蛋白產量，藉此計算抑制病毒之 EC_{50} 。在濃度為1 μ M時，對輔因子蛋白NS2B分別具62 %、61%、34 %的抑制率。

No.	Compound	EC 50
1	Destruxin A	0.749 ± 0.014
2	Destruxin E	0.764 ± 0.046
3	Destruxin A2	6.602 ± 1.263



第五章 結論

- 一、從固態發酵中分離純化出 Destruxin A、Destruxin E；從控制於 PH=4 的液態發酵中分離純化出 Destruxin A、Destruxin A2。實驗中也發現控制於 PH=12 的液態發酵中，透過 NMR 的檢測，未發現黑殭菌素(Destruxins)之成分。
- 二、在活性試驗中，針對人類肝癌細胞株 Huh-7，以登革熱第二型 (strain 16681) 病毒感染 2 小時後移除病毒液，加入 Destruxin A、Destruxin E、Destruxin A2 進行抗病毒測試，發現其抑制病毒的能力分別於 $EC_{50}=0.749 \pm 0.014$ 、 0.764 ± 0.046 、 6.602 ± 1.263 ，在濃度為 1 μ M時，對輔因子蛋白 NS2B 分別具

62 %、61%、34 %的抑制率。

三、由於黑殭菌素的分子較大，在結構解析方面較為複雜，目前尚有 4 個未解析出的黑殭菌素，將繼續進行解析，並進而進行 MTSassay kit 測定各黑殭菌素之細胞毒性(CC50)、以即時定量反轉錄-聚合酶連鎖反應 (Real time quantitative RT-PCR; RT-qPCR) 及 Western blotting 分析病毒 RNA 複製及蛋白產量，進而透過電腦軟體模擬有效成分之化學結構與大分子標靶蛋白進行分子對接(Molecular Docking Method)，以研究其交互作用。

參考文獻

1. 衛福部疾管署
2. Nature Reviews Immunology 11, 532-543 (August 2011)
3. Francisco Javier Diaz C., Microbiología de las infecciones humanas. Fundamentos Básicos de Medicina. Corporación para Investigaciones Biológicas: (2007).
4. Noble, C. G.; Shi, P.-Y., Structural biology of dengue virus enzymes: Towards
5. Flamand, M., Megret, F., Mathieu, M., Lepault, J., Rey, F. A. & Deubel, V. (1999). Dengue virus type 1 nonstructural glycoprotein NS1 is secreted from mammalian cells as a soluble hexamer in a glycosylation-dependent fashion. *J Virol* 73, 6104-10.
6. Lindenbach, B. D. & Rice, C. M. (1999). Genetic interaction of flavivirus nonstructural proteins NS1 and NS4A as a determinant of replicase function. *J Virol* 73, 4611-21.
7. Kummerer, B. M. & Rice, C. M. (2002). Mutations in the Yellow Fever Virus Nonstructural Protein NS2A Selectively Block Production of Infectious Particles. *J Virol* 76, 4773-4784
8. Arias, C. F., Preugschat, F. & Strauss, J. H. (1993). Dengue 2 virus NS2B and NS3 form a stable complex that can cleave NS3 within the helicase domain. *Virology* 193, 888-99.
9. Li, H., Clum, S., You, S., Ebner, K. E. & Padmanabhan, R. (1999). The serine protease and RNA-stimulated nucleoside triphosphatase and RNA helicase functional domains of dengue virus type 2 NS3 converge within a region of 20 amino acids. *J Virol* 73, 3108-16.
10. Miller, S., Kastner, S., Krijnse-Locker, J., Buhler, S. & Bartenschlager, R. (2007). The non-structural protein 4A of dengue virus is an integral membrane protein inducing membrane alterations in a 2K-regulated manner. *J Biol Chem* 282, 8873-82
11. Munoz-Jordan, J. L., Laurent-Rolle, M., Ashour, J., Martinez-Sobrido, L., Ashok, M., Lipkin, W. I. & Garcia-Sastre, A. (2005). Inhibition of alpha/beta interferon signaling by the NS4B protein of flaviviruses. *J Virol* 79, 8004-13
12. Nomaguchi, M., Ackermann, M., Yon, C., You, S. & Padmanabhan, R. (2003). De Novo Synthesis of Negative-Strand RNA by Dengue Virus RNA-Dependent RNA Polymerase In Vitro: Nucleotide, Primer, and Template Parameters. *J Virol* 77, 8831-8842.
13. Egloff, M. P., Benarroch, D., Selisko, B., Romette, J. L. & Canard, B. (2002). An RNA cap (nucleoside-2'-O-)-methyltransferase in the flavivirus RNA polymerase

- NS5: crystal structure and functional characterization. *EMBO J* 21, 2757-68.
14. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Jan. (2011), p. 229–238
 15. Vey, A. and Quiot, J. M. 1989. Effect cytotoxique in vitro et chez l'insect hôte destruzins, toxins cyclodepeptideiques produites par le entomopathogene *Metarhizium anisopliae*. *Can J. Microbiol.* 35, 1000-1008.
 16. Chen, H. C., Chou, C. K., Sun, C. M., Farn Y., Sheaua. 1997. Suppressive effects of destruxin B on hepatitis B virus surface antigen gene expression in human hepatoma cells. *Antiviral Research.* 34, 137-144
 17. Lee YP1, Wang CW, Liao WC, Yang CR, Yeh CT, Tsai CH, Yang CC, Tzeng YM In vitro and in vivo anticancer effects of destruxin B on human colorectal cancer. *Anticancer Res.* 2012 Jul;32(7):2735-45

科技部補助專題研究計畫出席國際學術會議 心得報告

日期： 106 年 9 月 15 日

計畫編號	105-2320-B-276-002-		
計畫名稱	探討本土性黑殭菌(Metarhizium anisopliae)、月橘 (Murraya paniculata L. Jack.) 所含二次代謝物及其抗登革熱病毒之研究		
出國人員姓名	林昀生	服務機構及職稱	美和學校財團法人美和科技大學
會議時間	106 年 9 月 3 日~ 106 年 9 月 7 日	會議地點	Switzerland, 瑞士 Basel, 巴塞爾
會議名稱	(中文) 第 65 屆藥用植物與天然物研究國際研討會 (英文) 65rd International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant (GA)		
發表題目	(中文) 印度塔樹枝葉中分離得到兩個新穎的天然物 Polyalongirin A、B。 (英文) Polyalongirin A-B, two novel linked compounds from the twigs of <i>Polyalthia longifolia</i>		

一、參加會議經過

本次會議舉辦於瑞士巴塞爾，台灣參加的學者主要分成三團集體前往，每一團約 10~20 餘人，我們這一團主要參加的學者們有來自於高雄醫學大學天然藥物研究所吳永昌、張芳榮、鄭源斌老師；中國醫藥大學中資系黃慧琪、李家琳老師；海洋生物博物館蘇瑞欣教授、中山大學許志宏、翁靖如、陳俊霖老師、還有本校劉至一老師與本人等人，一群人於 9/1 高雄出發至香港再轉機至德國法蘭克福機場，然後轉車至瑞士巴塞爾參與本次之會議，於 9/3 抵達會場後辦理註冊登記手續並參加 Together Party。於 party 中見到來自於世界各國的天然藥物研發學者，本次台灣參加的學者也遇到去年主辦會議的 Judit Hohmann 和 Dezso Csupor (Institute of Pharmacognosy, University of Szeged, Szeged)。本次相見歡會議極為盛大，會中參加的各國學者非常多。會中也認識了其中會議主辦單位 Prof. Dr. Matthias Hamburger，其是中山海資杜昌益老師的同學。會議第一天主要進行第 10 屆年輕學者的 workshop，其中 Dr. Attila Hunyadi 是我在中山大學修讀研究所時，曾經認識的博士後研究學者，其今年獲得 2017 GA symposium Egon-Stahl-Award in Silver, 並於會議中心受獎。會後則分為四個 short lecture session I (session I: Bioactive Natural Product、session II: Analytical Studies & Natural Products Chemistry I、session III: Phytopharmacology & Extract Pharmacology、session IV: poster)，分別有不同學者發表演講短篇研究論文 10~15 分鐘及海報問文發表。連續五天的會議，我們這一團並於 9/12 返台，結束這收穫豐富的會議。

二、與會心得

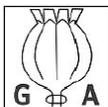
本次會議台灣學者參加的非常踴躍，包括許多天然物界的前輩：吳永昌、吳天賞、郭岳雄、許志宏等教授皆有參加此次會議，此會議舉辦的非常盛大，參加的各國學者非常多，在相見歡的 PARTY 中發現參加的人數約近 300 人以上，這次會議統計約有五百多名來自世界各國學者前來共襄盛舉，也因為此會議舉辦於歐洲地區，參加學者以歐洲地區的學者佔大多數，本會除了邀請研究學者進行九場大會演講 (plenary speech)，還有分三個場地的簡短演講發表 (short lectures)，讓各國學者選擇自己感興趣的相關研究主題的報告，進而使自己未來的研究題目有更深入的探討，會中張貼的論文海報 (poster sessions) 共計約 400 餘張。因此參加此會議，從各個會議廳中吸收得到全世界在天然藥物領域的最新研發成果，並由會議中認識其他國家的學者，也從參加的海報中發現，目前全世界之趨勢為由真菌、苔蘚類、海洋無脊椎生物中分離純化出二次代謝物，並應用於各種疾病與癌症。海報中發現近年許多學者對 Euphorbia 大戟屬的植物多所研究，未來可以多挖掘台灣特有種的大戟屬的植物，並研究開發該類之天然物應用。從會議報告與眾多發表 posts 中發現近期許多學者利用電腦模擬技術與先導活性藥物的結合，利用定量構效分析方法以縮短藥物研發時間。利用大量高純度的蛋白質進行結構之分析與鑑定，配合 X 繞射晶體技術、磁核共振光譜與電腦圖形工作站之技術，將蛋白質三度立體空間之測定與藥效團分析與活性分子 對接模擬，探討活性藥物分子與藥物作用標靶的結合情形。使得研究者可以從活性部位原子配置之構形 (conformation)，從事有效的藥物設計。並以電腦篩選方式來篩選 3D 化學資料庫 (NCI, ACD, WDI 等) 篩選出可當作藥物的先導化合物。本研討會主軸與本實驗室的研究領域相近，聆聽會議發表並與各國學者的交流和討論，再思考自己的研究，未來除了發展天然物領域之外，可以多和作生物活性與生物資訊

的學者多多接觸與連結，才能將活性天然物之活性與機轉研究得更為深入與透徹。希望未來能透過此活動促進國際交流與合作關係。

三、發表論文全文或摘要

摘要：

Two novel linked compounds, Polyalongirin A (**1**) and Polyalongirin B (**2**), have been isolated from the twigs of Taiwanese *Polyalthia longifolia*. They were composed of diterpene and alkaloid linkage for the first time, is an unprecedented natural N-1 and C-16 linked compound. Further purification was carried out by column chromatography, high performance liquid chromatography and recrystallization. All structures of the compounds were elucidated by NMR spectra and physical data (IR, mass spectrometry, ultraviolet, optical rotation). Their absolute structure were determined by X-ray.



Polyalongirin A-B, two novel linked compounds from the twigs of *Polyalthia longifolia*

Chia-Yi Kuo¹, Chi-I Chang¹, and Yun-Sheng Lin²*

¹ National Pingtung University of Science and Technology University, Pingtung 912, Taiwan, Republic of China
² Department of Biological Science and Technology, Meihou University, Pingtung 912, Taiwan, Republic of China

Abstract

Two novel linked compounds, Polyalongirin A (1) and Polyalongirin B (2), have been isolated from the twigs of Taiwanese *Polyalthia longifolia*. They were composed of diterpene and alkaloid linkage for the first time, is an unprecedented natural N-1 and C-16 linked compound. Further purification was carried out by column chromatography, high performance liquid chromatography and recrystallization. All structures of the compounds were elucidated by NMR spectra and physical data (IR, mass spectrometry, ultraviolet, optical rotation). Their absolute structure were determined by X-ray.

Extraction and Isolation

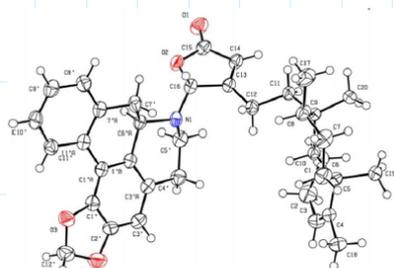
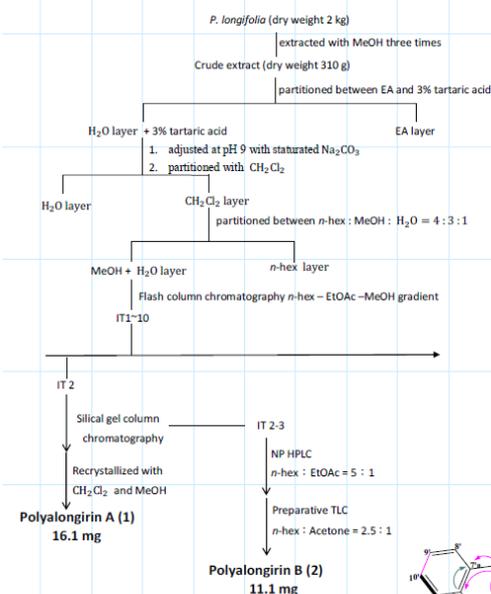


Fig. 1. X-ray crystallographic of Polyalongirin A (1)

Table 1. ¹H-NMR data for Polyalongirin A and B.

¹ H NMR Data of Polyalongirin A and B. δ in ppm, J in Hz.			
position	1 ^a	2 ^a	
1	1.52 (m)	1.52 (m)	
2	1.90 (m), 2.10 (m)	1.90 (m), 2.06 (m)	
3	5.18 (brs)	5.17 (brs)	
4	-	-	
5	-	-	
6	1.20 (m), 1.73 (m)	1.25 (m), 1.73 (m)	
7	1.37 (m)	1.40 (m)	
8	1.45 (m)	1.50 (m)	
9	-	-	
10	1.34 (m)	1.37 (m)	
11	1.62 (m), 1.70 (m)	1.60 (m), 1.70 (m)	
12	2.22 (m)	2.25 (m)	
13	-	-	
14	5.98 (s)	5.98 (s)	
15	-	-	
16	6.19 (s)	6.17 (s)	
17	0.79 (s)	0.79 (s)	
18	1.58 (s)	1.57 (s)	
19	1.00 (s)	1.00 (s)	
20	0.78 (s)	0.77 (s)	
1 ^a	-	-	
1 ^b	-	-	
2 ^a	-	-	
3 ^a	6.56 (s)	-	
4 ^a	-	-	
5 ^a	2.53 (m), 2.84 (m)	2.73 (m), 2.83 (m)	
6 ^a	2.59 (m), 2.72 (m)	2.55 (m), 2.85 (m)	
7 ^a	4.19 (dd, 10.5, 3.5)	4.05 (dd, 7.6, 7.0)	
8 ^a	3.3 (dd, 5, 4.5)	3.20 (dd, 3.5, 4)	
9 ^a	2.80 (m)	2.80 (m)	
10 ^a	7.25 - 7.35 (m)	7.51 (m)	
11 ^a	7.25 - 7.35 (m)	7.20 (m)	
12 ^a	7.25 - 7.35 (m)	7.24 (m)	
13 ^a	8.09 (d, 8.0)	8.25 (d, 7.5)	
14 ^a	-	-	
-OCH ₃	5.95 (s), 6.10 (s)	-	
1 ^c -OMe	-	3.95 (s)	
2 ^c -OMe	-	3.70 (s)	
3 ^c -OMe	-	3.92 (s)	

^aData were recorded in CDCl₃ on a Varian FT-90Q MHz apparatus.

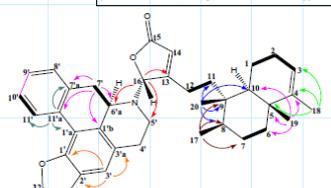


Fig. 2. COSY (---) and HMBC (---) correlations of Polyalongirin A (1).

Table 2. ¹³C-NMR data for Polyalongirin A and B.

¹³ C NMR Data of Polyalongirin A and B in ppm.			
position	1 ^a	2 ^a	
1	18.35 (t)	18.35 (t)	
2	26.9 (t)	26.88 (t)	
3	120.2 (d)	120.2 (d)	
4	144.4 (s)	144.4 (s)	
5	38.1 (s)	38.1 (s)	
6	38.6 (t)	38.5 (t)	
7	27.3 (t)	27.3 (t)	
8	38.4 (d)	38.4 (d)	
9	38.6 (s)	38.6 (s)	
10	48.5 (d)	48.4 (d)	
11	34.9 (t)	34.8 (t)	
12	22.1 (t)	22.1 (t)	
13	169.8 (s)	169.8 (s)	
14	118.7 (d)	118.5 (d)	
15	171.5 (s)	171.5 (s)	
16	83.9 (d)	83.9 (d)	
17	16.0 (q)	16.0 (q)	
18	17.9 (q)	17.9 (q)	
19	19.3 (q)	19.3 (q)	
20	18.2 (q)	18.2 (q)	
1 ^a	142.79 (s)	145.4 (s)	
1 ^b	116.6 (s)	122.8 (s)	
2 ^a	126.6 (s)	122.7 (s)	
3 ^a	146.9 (s)	150.2 (s)	
4 ^a	167.5 (d)	150.2 (d)	
5 ^a	126.4 (s)	130.9 (s)	
6 ^a	29.4 (t)	24.0 (t)	
7 ^a	41.3 (t)	48.9 (t)	
8 ^a	56.3 (d)	56.7 (d)	
9 ^a	33.7 (t)	33.7 (t)	
10 ^a	134.4 (d)	134.4 (d)	
11 ^a	127.3 (d)	127.3 (d)	
12 ^a	127.5 (d)	127.1 (d)	
13 ^a	128.4 (d)	128.1 (d)	
14 ^a	125.9 (d)	127.7 (d)	
15 ^a	130.8 (d)	131.7 (s)	
-OCH ₃	100.87 (t)	-	
1 ^c -OMe	-	60.9 (s)	
2 ^c -OMe	-	60.4 (s)	
3 ^c -OMe	-	60.6 (s)	

^aData measured at 125 MHz. δ = C, d = CH, t = CH₂, q = CH₃.

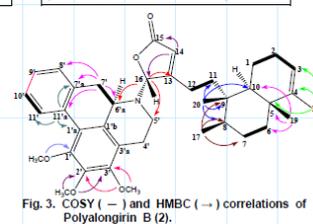


Fig. 3. COSY (---) and HMBC (---) correlations of Polyalongirin B (2).

References

- Chen, C.Y., Chang, F.R., Shih, Y.C. (2000) Cytotoxic Constituents of *Polyalthia longifolia* var. *pendula*. J. Nat. Prod. 63:1475-1478.
- Manasa, M. Vivek, M.N. (1987) Antibacterial activity of some active principles of *Polyalthia longifolia* leaves. Indian J. Pharmac. 19:216-220.
- Seikuo Nakamura, Souichi Nakashima (2013) Alkaloid constituents from flower buds and leaves of sacred lotus with melanogenesis inhibitory activity in B16 melanoma cells. Biorganic & Medicinal Chemistry. 21:779-787.
- Shunichi Manabe, Crikao Nishino. (1986) Stereochemistry of cis-clerodane diterpene. Tetrahedron. 42(13):3461-3470

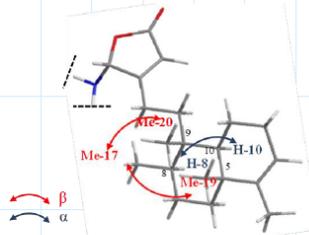


Fig. 4. The NOESY of clerodane diterpene

四、攜回資料名稱及內容

1. 65th GA 2017 International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research 議程與會議內容隨身碟

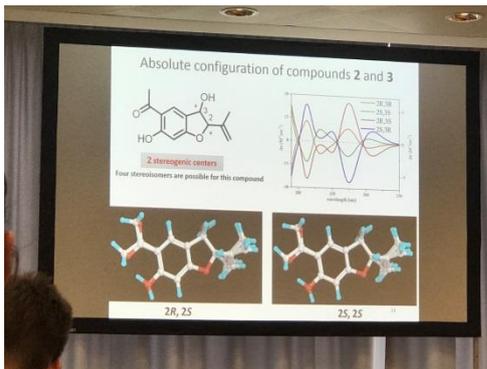
五、附錄



圖一



圖二



圖三



圖四



圖五



圖六



圖七



圖八

- 圖一：台灣學者 Together Party 合影
- 圖二：晚宴開幕式(Get Together Party)
- 圖三：session II:Analytical Studies
& Natural Products
Chemistry I
- 圖四：籌備主任主持演講
- 圖五~圖八：本人與三位研究生參加本會
議與海報發表

105年度專題研究計畫成果彙整表

計畫主持人：林昀生			計畫編號：105-2320-B-276-002-				
計畫名稱：探討本土性黑殭菌(Metarhizium anisopliae)、月橘 (Murraya paniculata L. Jack.) 所含二次代謝物及其抗登革熱病毒之研究							
成果項目			量化	單位	質化 (說明：各成果項目請附佐證資料或細項說明，如期刊名稱、年份、卷期、起訖頁數、證號...等)		
國內	學術性論文	期刊論文		0	篇	參加106/10/12 (2017南台灣健康照護暨健康產業學術研討會)發表論文 :Chemical Constituents and Biological Activities from the native Metarhizium anisopliae(MA126)	
		研討會論文		1			
		專書		0			本
		專書論文		0			章
		技術報告		0			篇
		其他		0			篇
	智慧財產權及成果	專利權	發明專利	申請中	0	件	
				已獲得	0		
			新型/設計專利		0		
		商標權		0			
		營業秘密		0			
		積體電路電路布局權		0			
		著作權		0			
		品種權		0			
		其他		0			
	技術移轉	件數		0	件		
		收入		0	千元		
	國外	學術性論文	期刊論文		0	篇	
			研討會論文		0		
專書			0	本			
專書論文			0	章			
技術報告			0	篇			
其他			0	篇			
智慧財產權及成果		專利權	發明專利	申請中	0	件	
				已獲得	0		
			新型/設計專利		0		
		商標權		0			

參與計畫人力		營業秘密	0			
		積體電路電路布局權	0			
		著作權	0			
		品種權	0			
		其他	0			
	技術移轉	件數	0	件		
		收入	0	千元		
	本國籍	大專生		2	人次	1. 本計畫可提供參與計畫之研究相關人員獲得有關天然物的萃取、分離純化之技術，並獲得有關天然物化學、檢驗分析、藥學方面、動物實驗的訓練。 2. 訓練研究人員對有機化合物之光譜測定與結構解析能力。 3. 參與之人員能學習到有機分子之結構修飾與分子生物等實驗，瞭解化合物與生物活性之相關性。在過程中，將可以訓練參與之工作人員與學生瞭解藥物開發之流程與技術，以增進人員未來生技製藥等方面之就業市場的能力，並透過合作以增進產學合作。讓參予的人員能對登革病毒之防治與治療有更進一步的認識與研究能力。
						1. 本計畫可提供參與計畫之研究相關人員獲得有關天然物的萃取、分離純化之技術，並獲得有關天然物化學、檢驗分析、藥學方面、動物實驗的訓練。 2. 訓練研究人員對有機化合物之光譜測定與結構解析能力。 3. 參與之人員能學習到有機分子之結構修飾與分子生物等實驗，瞭解化合物與生物活性之相關性。在過程中，將可以訓練參與之工作人員與學生瞭解藥物開發之流程與技術，以增進人員未來生技製藥等方面之就業市場的能力，並透過合作以增進產學合作。讓參予的人員能對登革病毒之防治與治療有更進一步的認識與研究能力。
		碩士生		2		1. 本計畫可提供參與計畫之研究相關人員獲得有關天然物的萃取、分離純化之技術，並獲得有關天然物化學、檢驗分析、藥學方面、動物實驗的訓練。 2. 訓練研究人員對有機化合物之光譜測定與結構解析能力。 3. 參與之人員能學習到有機分子之結構修飾與分子生物等實驗，瞭解化合物與生物活性之相關性。在過程中，將可以訓練參與之工作人員與學生瞭解藥物開發之流程與技術，以增進人員未來生技製藥等方面之就業市場的能力，並透過合作以增進產學合作。讓參予的人員能對登革病毒之防治與治療有更進一步的認識與研究能力。
1. 本計畫可提供參與計畫之研究相關人員獲得有關天然物的萃取、分離純化之技術，並獲得有關天然物化學、檢驗分析、藥學方面、動物實驗的訓練。 2. 訓練研究人員對有機化合物之光譜測定與結構解析能力。 3. 參與之人員能學習到有機分子之結構修飾與分子生物等實驗，瞭解化合物與生物活性之相關性。在過程中，將可以訓練參與之工作人員與學生瞭解藥物開發之流程與技術，以增進人員未來生技製藥等方面之就業市場的能力，並透過合作以增進產學合作。讓參予的人員能對登革病毒之防治與治療有更進一步的認識與研究能力。						
1. 本計畫可提供參與計畫之研究相關人員獲得有關天然物的萃取、分離純化之技術，並獲得有關天然物化學、檢驗分析、藥學方面、動物實驗的訓練。 2. 訓練研究人員對有機化合物之光譜測定與結構解析能力。 3. 參與之人員能學習到有機分子之結構修飾與分子生物等實驗，瞭解化合物與生物活性之相關性。在過程中，將可以訓練參與之工作人員與學生瞭解藥物開發之流程與技術，以增進人員未來生技製藥等方面之就業市場的能力，並透過合作以增進產學合作。讓參予的人員能對登革病毒之防治與治療有更進一步的認識與研究能力。						
1. 本計畫可提供參與計畫之研究相關人員獲得有關天然物的萃取、分離純化之技術，並獲得有關天然物化學、檢驗分析、藥學方面、動物實驗的訓練。 2. 訓練研究人員對有機化合物之光譜測定與結構解析能力。 3. 參與之人員能學習到有機分子之結構修飾與分子生物等實驗，瞭解化合物與生物活性之相關性。在過程中，將可以訓練參與之工作人員與學生瞭解藥物開發之流程與技術，以增進人員未來生技製藥等方面之就業市場的能力，並透過合作以增進產學合作。讓參予的人員能對登革病毒之防治與治療有更進一步的認識與研究能力。						
1. 本計畫可提供參與計畫之研究相關人員獲得有關天然物的萃取、分離純化之技術，並獲得有關天然物化學、檢驗分析、藥學方面、動物實驗的訓練。 2. 訓練研究人員對有機化合物之光譜測定與結構解析能力。 3. 參與之人員能學習到有機分子之結構修飾與分子生物等實驗，瞭解化合物與生物活性之相關性。在過程中，將可以訓練參與之工作人員與學生瞭解藥物開發之流程與技術，以增進人員未來生技製藥等方面之就業市場的能力，並透過合作以增進產學合作。讓參予的人員能對登革病毒之防治與治療有更進一步的認識與研究能力。						
博士生			0			
博士後研究員			0			
專任助理			0			
非本國籍	大專生		0			
	碩士生		0			
	博士生		0			
	博士後研究員		0			
	專任助理		0			
其他成果						

(無法以量化表達之成果如辦理學術活動、獲得獎項、重要國際合作、研究成果國際影響力及其他協助產業技術發展之具體效益事項等，請以文字敘述填列。)

科技部補助專題研究計畫成果自評表

請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況、研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）、是否適合在學術期刊發表或申請專利、主要發現（簡要敘述成果是否具有政策應用參考價值及具影響公共利益之重大發現）或其他有關價值等，作一綜合評估。

1. 請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況作一綜合評估

達成目標

未達成目標（請說明，以100字為限）

實驗失敗

因故實驗中斷

其他原因

說明：

2. 研究成果在學術期刊發表或申請專利等情形（請於其他欄註明專利及技轉之證號、合約、申請及洽談等詳細資訊）

論文： 已發表 未發表之文稿 撰寫中 無

專利： 已獲得 申請中 無

技轉： 已技轉 洽談中 無

其他：（以200字為限）

黑殭菌素(destruxins)之天然物應用在登革病毒是過去不曾研究過的。由研究結果指出，Destruxins對登革熱病毒之輔助因子NS2B蛋白具有抑制活性，未來將透過電腦軟體模擬化學結構與標靶蛋白進行分子對接(Molecular Docking Method)，研究化學結構與活性之關係(Structure-Activity Relationship)。

3. 請依學術成就、技術創新、社會影響等方面，評估研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性，以500字為限）

2016年，根據衛福部疾管局統計，台灣地區包含本土病例與境外移入病例，感染人數約4萬餘人，2百多人因此而死亡。目前在預防及治療登革熱策略上，本國並無核准任何疫苗與特殊藥物治療。查核過去研究發表期刊，黑殭菌素(destruxins)之天然物應用在登革病毒是過去不曾研究過的，登革病毒中之非結構蛋白NS2B為NS3重要的輔助因子(cofactor)，目前被認為是和病毒的蛋白質切割酵素N3有關聯，因此在開發抗登革熱病毒的研究中，常以找尋NS2B/NS3 Protease Inhibitor，當作指標以篩選抑制蛋白酶藥物，由研究結果指出，Destruxins對登革熱病毒之輔助因子NS2B蛋白具有抑制活性，未來將透過電腦軟體模擬有效成分之化學結構與大分子標靶蛋白進行分子對接(Molecular Docking Method)，以研究其交互作用，確認其真正作用位置，研究化學結構與活性之關係(Structure-Activity Relationship)，以利爾後進一步進行動物實驗。

4. 主要發現

本研究具有政策應用參考價值：否 是，建議提供機關
(勾選「是」者，請列舉建議可提供施政參考之業務主管機關)

本研究具影響公共利益之重大發現：否 是

說明：(以150字為限)