

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

樟芝生理活性物質之檢測及其生合成途徑相關基因之選殖  
與分析

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC92-3114-B-002-007-

執行期間：92年12月01日至93年12月31日

執行單位：國立臺灣大學植物病理與微生物學系暨研究所

計畫主持人：曾顯雄

共同主持人：蕭明熙，劉瑞芬，葉信宏

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 94 年 4 月 18 日

一、計畫主持人	曾顯雄
二、計畫名稱	樟芝生理活性物質之檢測及其生合成途徑相關基因之選殖與分析
三、計畫摘要：	
<p>樟芝之菌絲體初萃液，初步實驗證實對於肝癌細胞生長、繁殖具有抑制作用，其真正之有效成分，正待更進一步的分離、純化、分析鑑定。另一方面，已經完成建構樟芝菌絲體之 EST library，並選殖 6085 個 Clones 定序，比對基因庫，初步註解出 3270 個 Unigenes，並獲知其假設性之生理功能。此外，也完成建構菌絲體之 Fosmid library，並完成複製點選 7000 個 Clones，並正進行由選殖標識完成之 10 個與三萜類生合成有關之基因進行菌落雜交，去判定是否有基因串(Gene Cluster)之存在。此等基因之剔除或表現之探討也正在進行中。</p>	
四、引言、研究方法：	
<p style="text-align: center;"><b>引言</b></p> <p>牛樟材質優異為雕刻神像、奇木傢俱之高級材料，最近民間盛傳採自於天然林牛樟樹幹空洞內之牛樟菇可治癌症或緩解食物中毒、下痢、搔癢、腹痛等症狀，由於採集不易，加上民間需求殷切，以致供不應求，奇貨可居，進而引發萎民盜伐牛樟採取牛樟菇之風潮，被伐倒之牛樟因堆積腐朽不堪利用所遭受之損失年約台幣三仟萬元左右。此外，此等濫伐也將造成此台灣特有之珍貴樹種瀕臨滅絕，以及對森林多樣性及生態平衡之破壞。審視盜伐之主因</p>	

在於採取牛樟菇之子實體，而牛樟菇至目前為止尚無法於人工栽培之條件下出菇，若能究明牛樟菇人工栽培之出菇條件，則可技術移轉，大量栽培，以供民間所需，間接也將使盜採牛樟菇之誘因消失，而得以消弭盜伐牛樟歪風，保育此珍貴樹種。

此外，牛樟菇之藥效，大皆止於傳聞，雖然近年來此菌之生物活性物質已逐漸被純化、分離、鑑定，此類之物質大皆為 steroids, triterpenoids, sesquiterpene lactone, zhankuic acid F, 及 biphenyl compounds<sup>8,9,10,11</sup> 等。其中 zhankuic acid A(1)顯示對於老鼠之白血病細胞具毒性作用，而 B(2)則呈現微弱抑制神經傳導或其傳導物質之活性<sup>14</sup>，但有關其它癌症抗癌試藥皆付闕如，直至最近方有對樟芝菌絲體之液體深層發酵<sup>3</sup>，固體培養<sup>4</sup>，以及對其生物活性、毒性、及對動物遺傳值或受孕胚胎成長發育成長之評估<sup>3</sup>。鑑諸真菌自身或其初級或次級代謝產物極具發展醫學應用潛能，故牛樟菇活性及出菇是亟待更進一步驗證和研發。

牛樟菇 [*Antrodia (Ganoderma) camphorata*] 為多孔菌科薄孔菌屬(*Antrodia karst*)之成員，可造成牛樟之心材褐腐，為台灣之特有種，此屬之成員在台灣除牛樟菇這一種外，尚有 *A. xantha*, *A. taxa*, *A. lalashana* 等三種被描寫記載，此等菌類其類緣關係、生理特性、生物活性物質也將於本計劃中一併探討。

## 研究方法

本計畫第一年擬鑑定樟芝所含之特殊生理活性物質，並配合樟芝生理活性物質的鑑定建立樟芝 EST 資料庫，一旦鑑定出生理活性物質即能由 EST 資料庫尋找樟芝生理活性物質生合成相關基因。在取得特定 EST cDNA clone 後，我們將進一步利用外源蛋白表現系統(大腸桿

菌或酵母菌蛋白表現系統)製備重組蛋白以便進行生體外(*in vitro*)生化功能分析，或在活體利用大量表現(over expression)或(與)基因剔除(genetic knockout)分析基因功能。此外，為求進一步迅速獲取與特定功能性成份之生合成有關之基因，我們也擬建構樟芝之 Fosmid library，以便選殖出完整之基因或 gene cluster，以供後續進行各基因之功能性與結構分析。各年度計畫之工作項目分述如下：

## 第一年

### (一)樟芝功能性成份分析

#### (1)菌株來源、保存與培養

本研究所使用之樟芝菌株分離自台中縣和平鄉雪山路之野生樟芝，平常保存於馬鈴薯—葡萄糖—洋菜斜面試管(Potato dextrose agar slant, PDAs)。進行培養時首先將菌種移植於半 PDA 和半玉米粉—洋菜培養基 (corn meal agar, CMA)，於 30°C 培養 14 天。之後刮取表生、氣生之菌絲體，置於內裝 10 顆直徑 5 mm 玻璃珠、5 ml 無菌水之試管中，振盪 10 分鐘，再取 1 ml 接入液態培養基，於 28°C，200 rpm 振盪培養 21 天。

#### (2)樟芝次級代謝物之分離與純化

樟芝次級代謝物，尤其是三萜類物質之萃取與純化步驟主要參照 Shiao *et al.* (1994) 及 Su *et al.* (2001)所描述之方法進行。取樟芝菌絲以粉碎機粉碎後，加入 10 倍體積之 methanol (W/V)混合均勻，置於 4°C 萃取 12 小時。萃取液經濾膜過濾後，以真

空旋轉濃縮機將體積濃縮為原體積之 1/10，並加入適量 silica gel 以進行樟芝次級代謝物之吸附。要進行樟芝次級代謝物流洗時，應先進行 silica gel 管柱填充，再依序更換沖提液，所使用之沖提液依次為(1) hexane 及 ethyl acetate 以等比例混合、(2) ethyl acetate、(3) ethyl acetate 及 methanol 以等比例混合、methanol。所收集後之分離液以真空濃縮機濃縮微小體積後，即可以棕色樣品瓶保存於 4°C 備用。之後，將應用 HPLC 技術進一步進行分離液成份分析及各成份之生理活性分析。

### (3)樟芝次級代謝物之生理活性分析

樟芝次級代謝物之生理活性分析主要將分兩個部分進行：

(A) 分析其對肝癌細胞株 HepG2 生長之影響將肝癌細胞株；按標準條件將 HepG2 培養於小牛細胞血清培養基(內含 1% Antimycotic)，以供分析樟芝次級代謝物之生理活性，並分別以抗肝癌細胞藥劑 Mitomycin 及 dimethylsulfoxide (DMSO)為實驗之正/負對照組。HepG2 細胞株以不同劑量之樟芝次級代謝物(溶於 0.4% 之 DMSO)分別處理後，以 alamar blue 進行細胞染色，再應用血球計數器計數處理前後之細胞存活數目，以作為樟芝次級代謝物抑制肝癌細胞活性之評估依據。

(B) 以飼養之小白鼠 (ICR male mouse)，當為活體試驗模式，將四氯化碳 (CCl<sub>4</sub>)以皮下注射之方式注入小白鼠之體腔(10 ml/kg)，而樟芝之萃取液(100 mg/kg)則於注射前半小時或注射後 4 或 8 小時後以同一方式注入小白鼠體內。24 小時後收集小白鼠血液檢測其 GPT (glutamate pyruvate transaminase) 和 GOT (glutamate oxaloacetate transaminase)之活性，所測定之值若比試驗所使用之溶劑對照組降低

30%，則表示具顯著保護肝臟機能之效益。

## (二) 樟芝 EST 資料庫的建立

### (1) 樟芝 cDNA library 的構築

將適量樟芝菌絲放在研鉢中加入液態氮磨成粉狀，加入 10 ml 之 Trizol reagent (GIBCO-BRL) 混合均勻，離心後取上清液加以沈澱、離心而取得 total RNA。Poly (A)<sup>+</sup> RNA 之純化採用 Oligotex 套組(Qiagen, Chatsworth, CA)，並取 5 µg Poly (A)<sup>+</sup> RNA 利用 Unip-ZAP XR cDNA 合成套組(Stratagene, La Jolla, CA) 合成 cDNA 及進行樟芝 cDNA library 之構築。進一步根據廠商所建議之方法進行 *in vivo* excision 後所獲得之 plasmid 選殖株將以 15% glycerol 保存於-80°C 冰箱中。

### (2) 樟芝 ESTs 資料庫的建立

自所獲得之 plasmid 選殖株隨機挑選約 5000 個選殖株，以 Qiagen R. E. A. I. Prep 96 系統進行質體之分離，並以 T7 primer 進行 dye-terminator cycle sequencing 進行 DNA 定序，所得之序列則利用 TIGER 網站上之 LUCY 軟體(<http://www.tigr.org/softlab/>) 移除載體與 3' 品質較差的序列，Contigs 則利用 PHRAP (<http://bozeman.mbt.washington.edu/phrap.docs/phrap.html>) 軟體加以組合。所有 ESTs 序列再以 National Center for Biotechnology Information BLASTX (Altschul *et al.* 1990) 針對 GeneBank、*Neurospora crassa* (<http://www-genome.wi.mit.edu/annotation/fungi/neurospora/>) 及酵母菌 (*Saccharomyces cerevisiae*) 基因資料庫 (<http://www.yeastgenome.org/>) 進行比對，比對結果中 E value 小於 0.01 之

序列將依據功能加以整理。

#### (四) 建構樟芝 Fosmid library

##### (1) 樟芝 genomic DNA 之抽取

接種及培養適當時間後，收集樟芝菌絲、以液態氮急速冷凍，再利用真空冷凍乾燥機進行菌絲冷凍乾燥。要抽取 DNA 時，先將乾燥菌絲研磨成粉狀，加入適量 extraction buffer [0.2 M Tris (pH 8.5), 0.25 M NaCl, 25 mM EDTA (pH 8.0), 0.5% SDS] 及 RNase A 混合均勻後，放置於  $5^{\circ}\text{C}$  作用 1 hr。接著以  $12,000\text{ g}$  於  $4^{\circ}\text{C}$  離心 10 min、收集上清液，並以 phenol/chloroform 及 chloroform 進行萃取，最後將所收集之上清液移入新的微量離心管，加入 0.1 倍體積之 3 M sodium acetate (pH 5.2) 及 2 倍體積之絕對酒精混合均勻，再放置於  $-20^{\circ}\text{C}$  冷凍櫃進行 DNA 沉澱。隔天，離心收集 DNA 沉澱物、靜置於室溫使其自然風乾，再以適量 TE buffer [1m mM Tris (pH 8.0), 1 mM EDT A] 溶解，即可以進行 DNA 定量以供後續實驗之用。

##### (2) Fosmid library 之建構

樟芝 Fosmid library 將以 EPICENTRE Technologies (Madison, WI) 所生產之 EpiFOS™ Fosmid Library Production Kit 及其所建議之方法進行建構。以機械方式打斷樟芝 DNA 後，依序進行(1) end-repair (使 DNA 片段之 ends 成為 blunt and 5' -phosphorylated)、(2) 瓊脂膠體電泳分析、(3) 自瓊脂膠體回收長度為 40 Kb 左右之 DNA 片段、(4) 與載體 pEpiFOS-5 之 ligation 反應、(5) Packaging of the Fosmid clones、及(6) Plating on the *E. coli* strain EPI100™-T1<sup>R</sup> 並決定 Fosmid library

之 titer。

## 第二年

- (一)整理及分析樟芝 EST 序列
- (二)剖析樟芝重要功能性成份之生合成途徑
- (三)針對重要生合成基因進行 Fosmid library 篩選，並進行 Fosmid 選殖株之序列分析
- (四)建立樟芝基因轉殖系統

## 第三年

- (一)建立以大腸桿菌或酵母菌蛋白質表達系統進行樟芝蛋白質表現之方法
- (二)建立以外源系統表現樟芝重要功能性成份之技術
- (三)應用樟芝基因轉殖系統進行樟芝重要基因之功能性分析

## 五、研究成果與討論：

### 研究結果與討論

#### 生物活性物質檢測

為檢測樟芝培養菌液對肺癌細胞株 (A549) 之影響，取在 PDA 培養基培養 30 天之樟芝 5 皿，刮取菌絲至含 50 ml PDB 之血清瓶中，搖晃 3 分鐘，使斷生孢子完全溶於 PDB 培

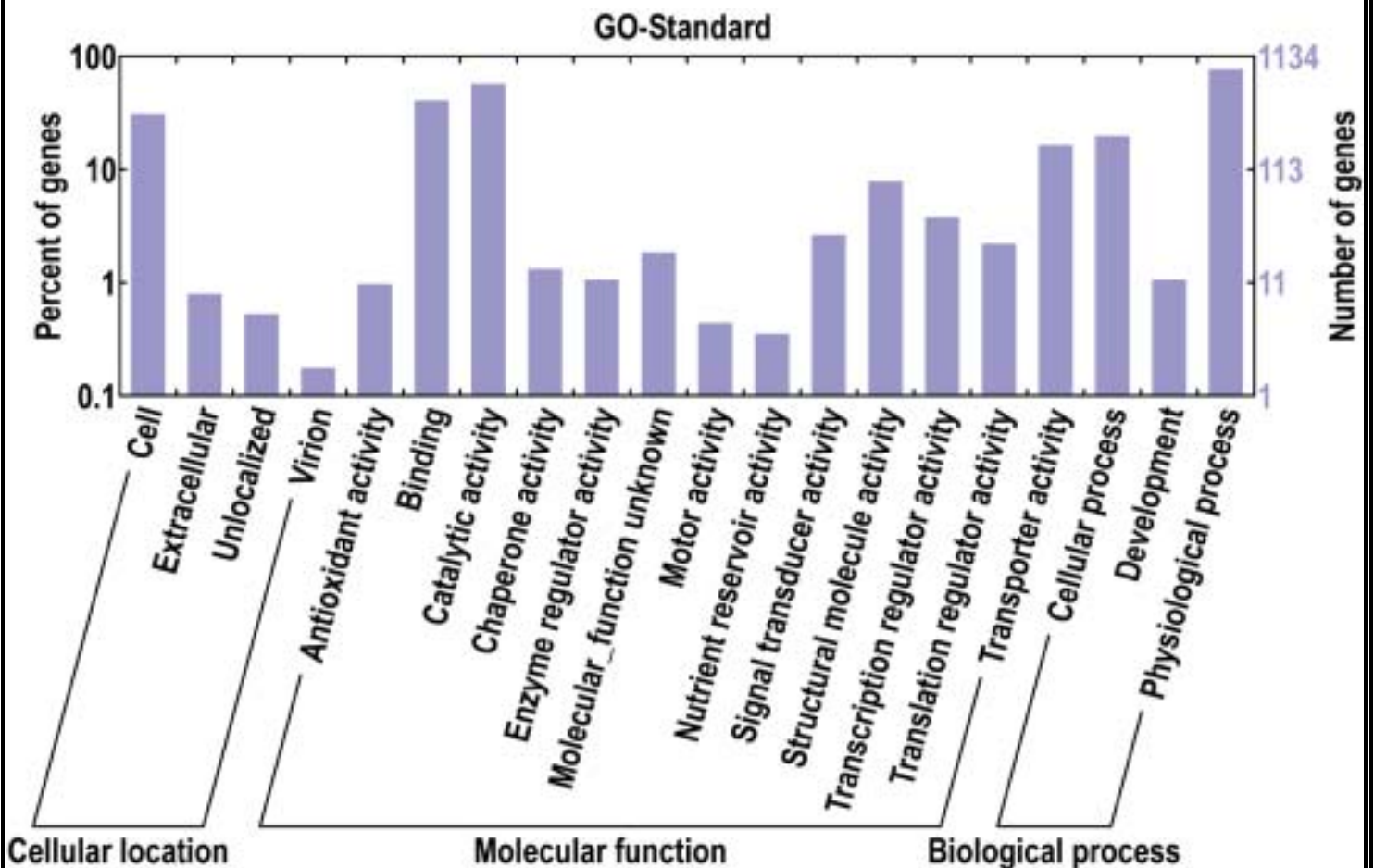


養液中，將含有斷生孢子之培養液經襯有一層 Miracloth 之漏斗過濾，收集只含斷生孢子之過濾液，將此過濾液取 1ml 接種於含 250 ml PDB 之圓底燒瓶內，分別培養 25°C 15、30、45 及 60 天（包含靜置與 SHAKING 150 rpm 兩種方法）。分別將 A549 及 3T3 細胞濃度調整到  $1 \times 10^4$  cells/ml ( $50 \mu\text{l/well}$ )，放入 96 孔細胞培養盤，以 DMEM 及 F12 培養基含 10% 胎牛血清及適量之抗生素，於 5%  $\text{CO}_2$ 、37°C 培養 3 小時。接著分別加入  $50 \mu\text{l}$  以樟芝之液體培養液減壓濃縮 40、20、10 及 5 倍序列稀釋的樟芝液體培養液之濃縮液，細胞對照組則加  $50 \mu\text{l}$  含有 10% 胎牛血清之 DMEM 及 F12 培養基，於 5%  $\text{CO}_2$ 、37°C 培養 3 天。置於 37°C 作用 72 小時，採用血球計數器檢測細胞數目，以評估藥物毒性。其結果顯示經菌液處理之細胞全數死亡而對照組生長情況良好。

### 活性物質生合成相關基因選殖

本實驗以於 27°C，PDM 培養基進行液態培養 32 天之樟芝菌絲體為材料，經冷凍乾燥後，以 Trizol 抽取 total RNA，利用 ZAP Express cDNA Synthesis Kit (Stratagene) 及 ZAP Express cDNA Gigapack III Gold Cloning Kit (Stratagene) 建構 cDNA library。此 library 之 insert size 介於 0.3~3kb 之間，增幅前 (unamplified library) 之 titer 為  $4.7 \times 10^5$  pfu/ml、recombinant efficiency 為 94.76%、package efficiency  $1.38 \times 10^5$  pfu/ $\mu\text{g}$ ，經增幅後 (amplified library) 之 titer 為  $1.65 \times 10^9$  pfu/ml。進一步進行 *in vivo* excision，所得之 plasmid 建構 EST library 經 spread 後，任意選取 20000 個 clones 保存，又另選取 6085 個 clones 進行定序及序列比對。將定序的 6085 條序列以 PHRAP 進行 assembly，剔除 2365 重覆之基因序列 (約佔 38.87%) 後，可大約註解出 3720 個 unigenes，包括 1497

個 contigs，以及 2233 個 singlets (圖一)，此等 unigene 之 open reading frame (ORF)，其長度約介於 300-2321 bp 之間，但約 95% 以上之長度超過 600 bp。另一方面就功能性而言，與 cellular component 有關者的佔 9.9%，與 molecular function 有關者的佔 41.6%，而與 biological process 有關者的佔 29.8%，其餘 unclassified genes (hypothetical protein) 則約 18.6% (圖一)。

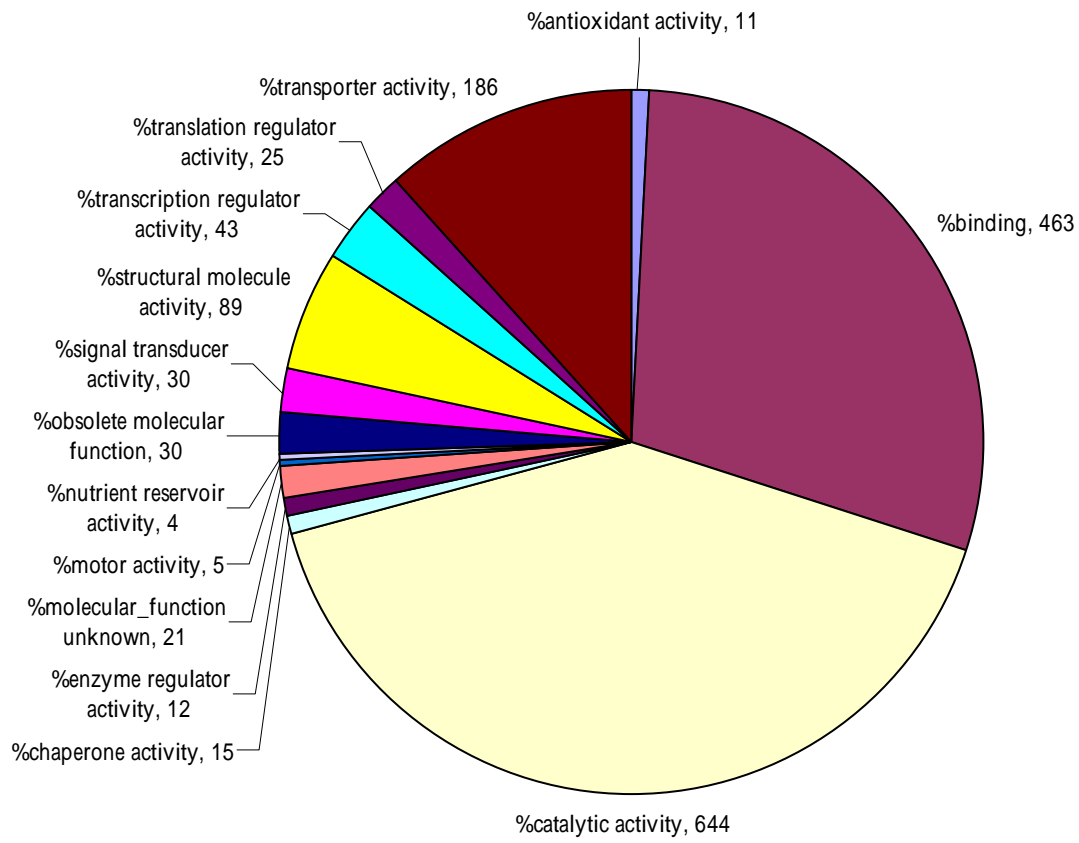


圖一 已註解之樟芝基因及其相對出現頻率

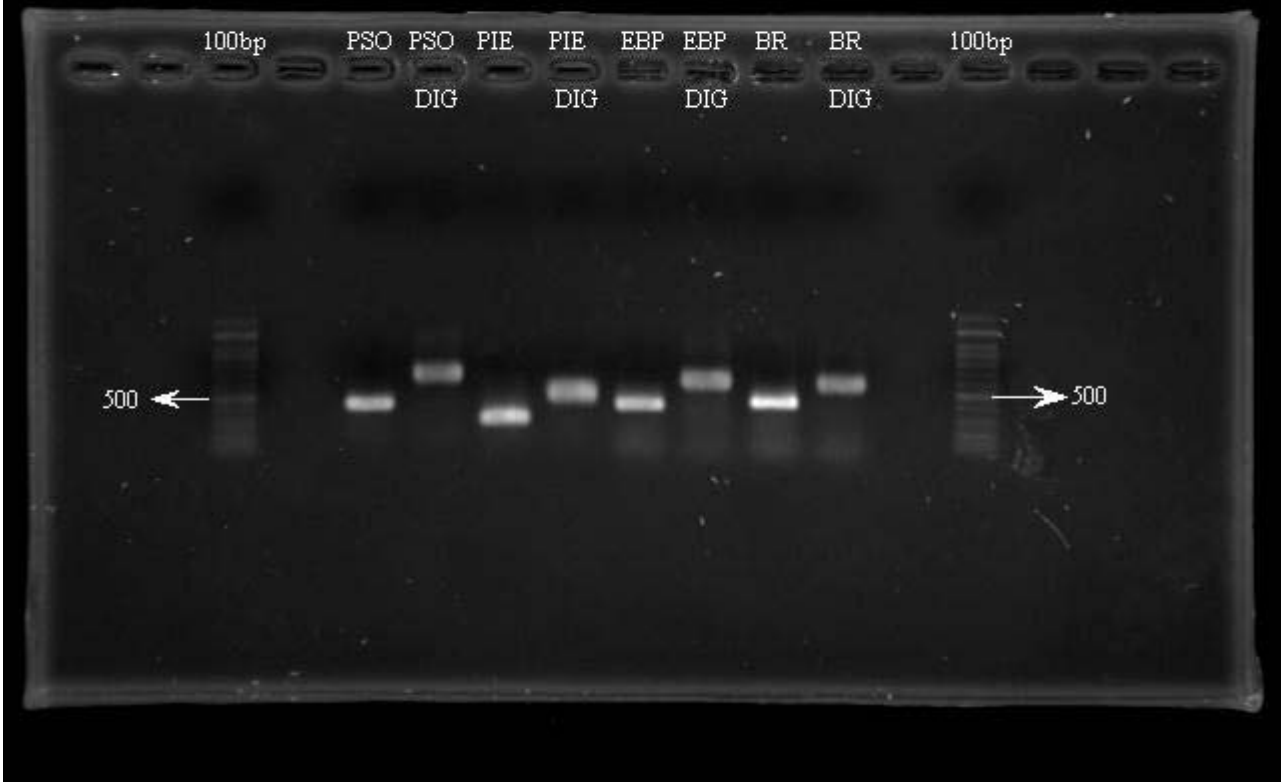
就 molecular function 之 gene ontology (CGO) 而言，基因的出現頻率和 catalytic activity 有關者 644 個最多，其次為和 binding 有關之 protein (463 個)，再其次為和 transporter activity 有關之 protein (186 個) (圖二)。在此 unigene 中，約有 10-15 個基因為和三萜類之合成代謝途徑有關之酵素，至少有 10 個已用 DIG 標識 (圖三)，目前正準備和已建構完

成之 Fosmid library(圖四、五)並點選複製於尼龍膜 (約 7000 個 clones)上之菌落進行雜交 (colony hybridization)，咸信最近將可獲取具反應訊息之 colony，之後將再利用 shotgun 之選殖方式進行此專一性之 fosmid clone 之全長度解序，以探討是否具基因串 (gene cluster) 之結構以及瞭解其所負載之功能為何。此外由已知之基因庫中也可比較出和多醣類合成有關之基因，如 chitin synthase，glucanase synthase， $\alpha$ -1,3-glucosyltransferase，mannosyltransferase，另外一方面，也發現有可以分解昆蟲、線蟲體壁或真菌細胞壁之 N-acetylglucosaminidase，chitinase 或分解植物細胞壁纖維素、木質素之 cellulase，cellobiase lignin-peroxidase。按牛樟菌為褐腐菌 (brown rot fungus)，為弱病原菌，應不會造成植物之白腐，那 Lignin peroxidase gene，為何存在、其功能如何，應有待更進一步探討。此外，有些基因其功能和 antioxidant，alkaloid 生合成有關，也皆值得將其選擇，由大量表現或剔除 (knockout) 之途徑去驗證其生理功能。若具潛力則將選殖於適當宿主大量表現，以研發可資應用之代謝產物。

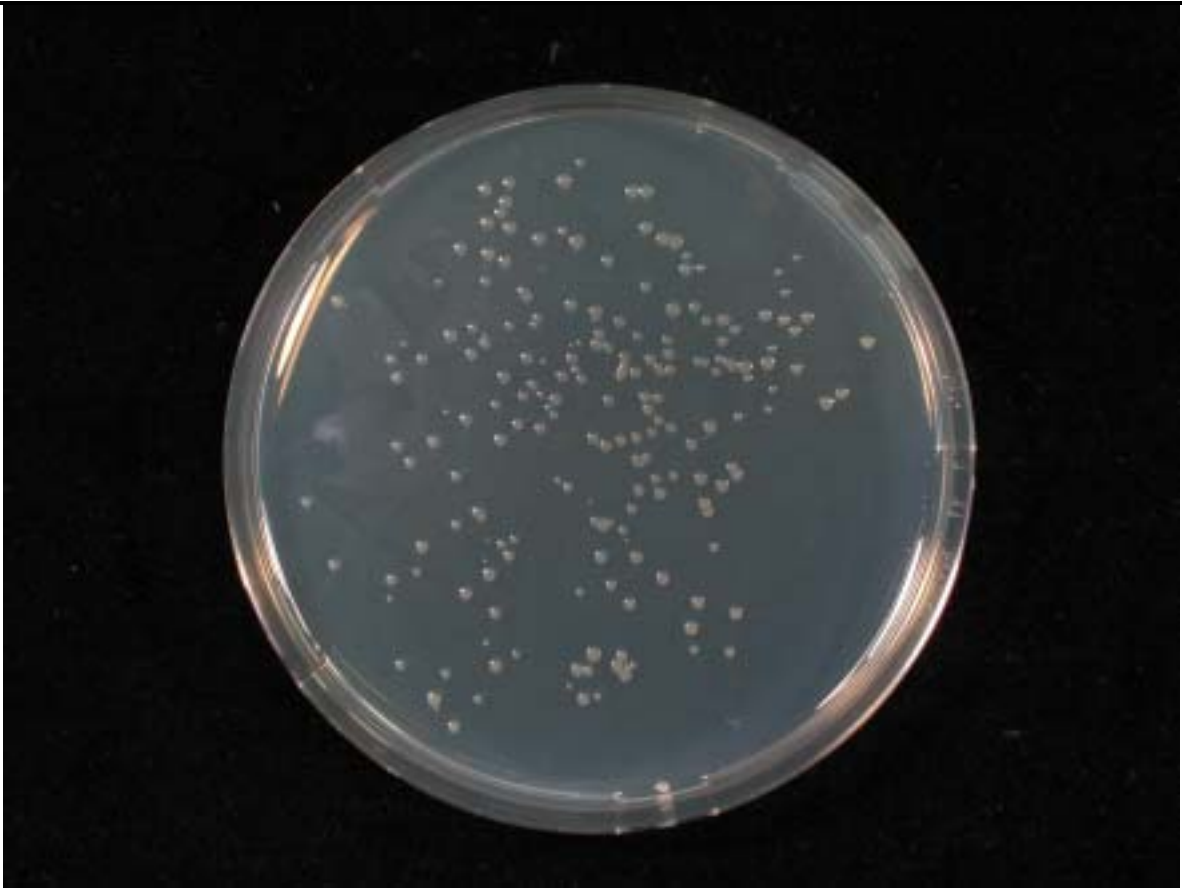
# GO Function



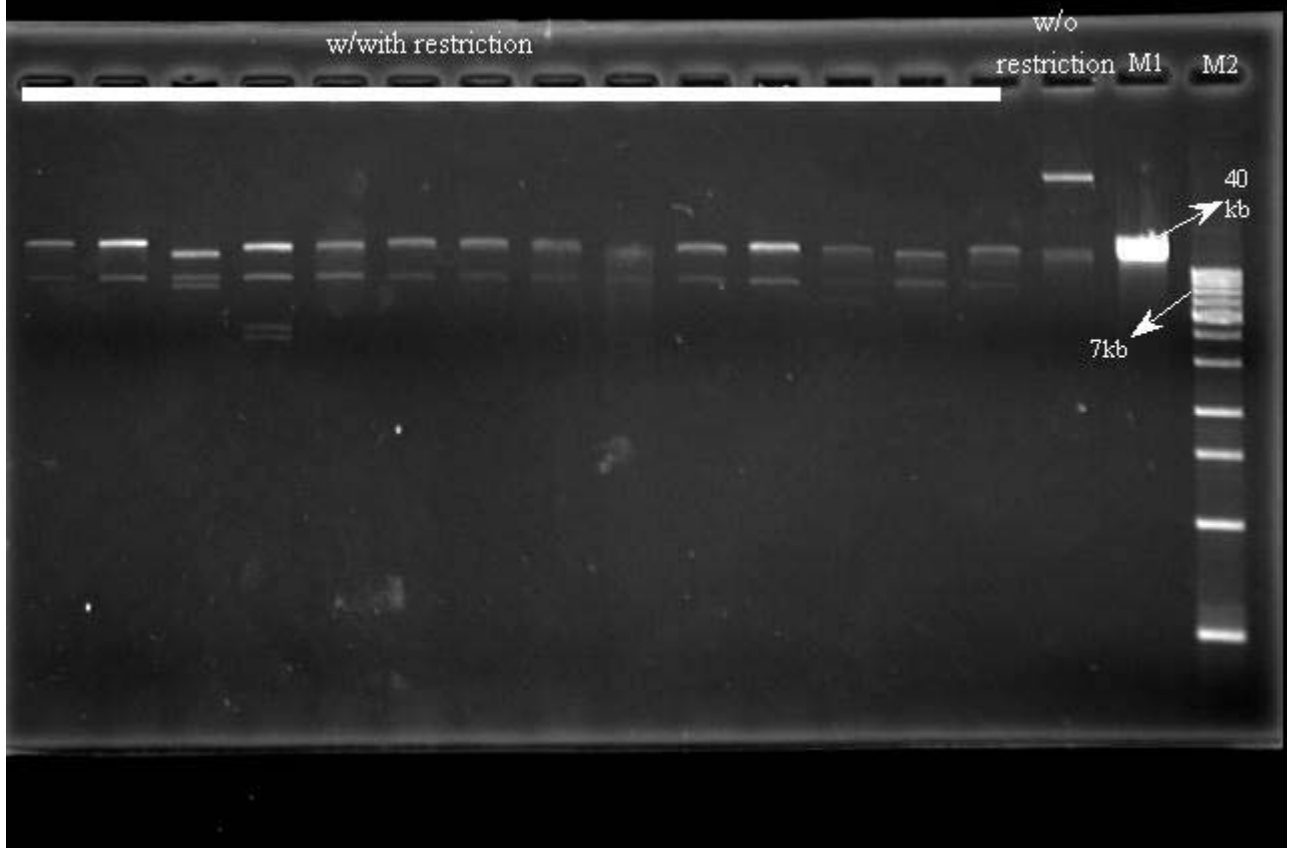
圖二 樟芝機能性基因之出現相對頻率



圖三 已標識之三萜類核酸探針



圖四 Fosmid library 菌落(稀釋十倍)



圖五 限制酵素酵解與未酵解之 Fosmid plasmid

## 六、參考文獻：

### 參考文獻

- 王聲遠、蕭明熙。2001。開發真菌次級代謝物為醫藥品。中華真菌學會會刊 16: 1-6。
- 張東柱。1997。牛樟之病害。牛樟生物學及育林技術研討會論文集，林業叢刊第 72 號，pp. 127-131。
- 陳勁初、林文鑫、陳清農、許勝傑、黃仕政、陳炎鍊。2001。台灣特有真菌—樟芝菌絲體之開發。中華真菌學會會刊 16:7-22。
- 陳啟楨、蘇慶華、藍明煌。2001。樟芝固體栽培及其活性之研究。中華真菌學會會刊 16: 65-72。
- 曾顯雄、張東柱。2001。牛樟菇之生物活性物質檢測及其出菇條件探討。林務局研究計畫報告。

Allona, I., Quinn, M., Shoop, E., Swope, K., Cyr, S.S., Carlis, J., Riedl, J., Retzel, E., Campbell, M.M., Sederoff, R., and Whetten, R.W. 1998. Analysis of xylem formation in pine by cDNA sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:9693-9698.

Chang, T. T. and Chou, W. N. 1995. *Antrodia cinnamomea* sp. nov. on *Cinnamomum kamehirai* in Taiwan. *Mycol. Res.* 99: 756-758.

Chen, C. H. and Yang, S. W. 1995. New steroid acids from *Antrodia cinnamomea*, a fungal parasite of *Cinnamomum micranthum*. *J. Nat. Prod.* 58: 1655-1661.

Cherng, I. H. and Chiang, H. C. 1995. Three new triterpenoids from *Antrodia cinnamomea*. *J. Nat. Prod.* 58: 365-371.

Cherng, I. H., Wu, D. P., and Chiang, H. C. 1996. Triterpenoids from *Antrodia cinnamomea*. *Phytochemistry* 41: 263-267.

Chiang, H. C., Wu, D. P., Cherng, I. H., and Cueng, C. H. 1995. A sesquiterpene lactone, phenyl and biphenyl compounds from *Antrodia cinnamomea*. *Phytochemistry* 39: 613-616.

Guterman I., Shalit M., Menda N., Piestun D., Dafny-Yelin M., Shalev G., Bar E, Davydov O., Ovadis M., Emanuel M., Wang J., Adam Z., Pichersky E., Lewinsohn E., Zamir D., Vainstein A., and Weiss D. 2003. Rose Scent: Genomics Approach to Discovering Novel Floral Fragrance-Related Genes. *Plant Cell* 14:2325-2338.

Hseu, Y.C., Chang, W.C., Hseu, Y.T., Lee, C.Y., Yech, Y.J., Chen, P.C., Chen, J.Y., and Yang, H.L. 2002. Protection of oxidative damage by aqueous extract from *Antrodia camphorata* mycelia in normal human erythrocytes. *Life Sci.* 71:469-482.

Hsiao, G., Shen, M.Y., Lin, K.H., Lan, M.H., Wu, L.Y., Chou, D.S., Lin, C.H., Su, C.H., and Sheu, J.R. 2003. Antioxidative and hepatoprotective effects of *Antrodia camphorata* extract. *J. Agri. Food Chem.* 51:3302-3308.

Lange, B.M., Wildung, M.R., McCaskill, D., and Croteau, R. 1998. A family of transketolases that directs isoprenoid biosynthesis via a mevalonate-independent pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:2100-2104.

Lee, I.H., Huang, R.L., Chen, C.T., Chen, H.C., Hsu, W.C., and Lu, M.K. 2002. *Antrodia camphorata* polysaccharides exhibit anti-hepatitis B virus effects. *FEMS Microbiol. Lett.* 209:63-67.

Ohlrogge, J. and Benning, C. 2000. Unraveling plant metabolism by EST analysis. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3:224-228.

Song, T.Y. and Yen, G.C. 2002. Antioxidant properties of *Antrodia camphorata* in submerged



culture. J. Agri. Food Chem. 50:3322-3327.

Sterky F., Regan S., Karlsson J., Hertzberg M., Rohde A., Holmberg A., Amini B., Bhalerao R., Larsson M., Villarreal R. *et al.* 1998. Gene discovery in the wood-forming tissues of poplar: analysis of 5,692 expressed sequence tags. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:13330-13335.

Wu, S. H., Rjvarden, L., and Chang, T. T. 1997. *Antrodia camporata* (“niu-chang- chih”), new combination of medicinal fungi in Taiwan. Bot. Bull. Acad. Sin. 38: 273-275.

Yang, S. W., Shen, Y. C., and Chen C. H. 1996. Steroids and triterpenoids of *Antrodia cinnamomea*— a fungal parasite on *Cinnamomum micranthum*. Phytochemistry 41: 1378-1392.

#### 七、對本計畫有何建議：

本計畫如欲完成完整性之探討，從樟芝功能性活性物質之分析到其相關基因之選殖、大量表現，再於活體驗證其功能，以致於最後通過科學驗證之健康食品上市或通過 phase 1 檢測之先導藥(leading drug)之研發，至少需費時 3-5 年，但本計畫目前只通過一年，其餘所研擬計畫之支持性經費似尚未編列，若有可能繼續編列支援，則對此計畫之順利執行以及預期成果之展望應有相當助益。