

製藥與生物技術國家型計畫年度研究成果報告

海洋天然藥物開發研究-海洋微細藻類之抗癌、
抗病毒藥物開發與其他活性物質探討

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC90-2323-B-002-011

執行期間：90年8月1日至91年3月31日

計畫執行單位：國立台灣大學 漁業科學研究所

計畫主持人：周宏農

共同主持人：

中華民國九十一年五月十日

腫瘤及病毒現今仍為造成人類因死亡的主要原因之一。由於尚無有效的控制藥物與治療方法，至今仍無法有效控制此類疾病。為克服由腫瘤及病毒所造成的死亡，目前一方面是由疾病模型與致病機制著手，而另一方面則由新藥物的開發與藥物機制上的研究來進行。本研究計畫為結合三位海洋天然物研究學者，及另二位海洋藻類及動物分類學者所申請的整合型計畫之一，主題為台灣產海洋微細藻類之抗癌與抗病毒活性化合物之分離與結構鑑定，期能在執行期間，配合國家衛生研究院生物技術與藥物研究組所提供之新藥研究核心設施，找尋並提供合成化學家及藥物化學家開發新藥所需之先導物質，以提升我國在醫藥開發與生物技術方面的競爭力。

二、計畫目標：

本計畫訴諸海洋微細藻類為題材，致力於抗癌及抗病毒藥物開發的研究；配合總計畫的採樣首先由台灣高歧異度的海洋環境中單離出不同種類的微藻，嘗試以各種不同的生長條件進行培養後，以建立本省第一個具有規模的微細藻種源庫為首要目標，期能以此奠定良好基礎，使後續抗癌活性的篩檢及純化工作能順利執行；實驗室另行建立分析 protein phosphatase 抑制活性的方法，在篩檢抗癌活性的同時能篩檢具有抑制 protein phosphatase 活性的藻株分液，最後並與國衛院抗癌活性的結果進行比對；續針對具有強烈活性且容易栽培的藻株進行大規模的培養，期能由此純化並鑑定出 20 種以上具有活性之化合物，為後續藥物開發之研究奠定良好的基礎。

三、執行進度：

1. 研究成果：

在種源庫部份業經培養成功的微細藻包括 88 株的渦鞭毛藻、65 株的藍綠藻、5 株的矽藻，以及定鞭藻、綠藻各 1 株，共計 160 株；另有 34 株紅藻及褐藻絲狀體亦在保種之列(表一)，而此豐富完整的種源庫成為後續分離活性天然物之良好來源。目前藻株數量仍持續擴增當中。

在抗癌活性篩檢部份已完成 127 株微細藻的 381 個分液及 8 株紅藻絲狀體的 24 個分液的送測，測試項目包括國衛院的 NUGC 胃癌細胞株及 HONE-1 鼻咽癌細胞株的細胞毒殺活性測試，結果所有來自紅藻絲狀體的分液均未發現活性，然微藻部份則有來自 35 株藻的 56 個分液具有強烈的癌細胞毒殺活性(表一)；具有活性的藻株以渦鞭毛藻為主，其中 *Amphidinium* 及 *Prorocentrum* 屬的藻株有非常高的比例具有活性，且同一藻株往往有多個分液具有活性，因此後續便由中挑取較易生長的藻株進行大規模的培養，以利後續純化所需。

活性物質純化鑑識部份，目前已完成所有 *Prorocentrum* 藻株的活性化合物純化及鑑定的工作(圖二)。其中 OA 及 DTX-1 經送測國衛院進行細胞毒殺活性測試的結果，發現其在 10 μ M 的低濃度下即對 HONE-1 及 NUGC 有顯著之毒殺活性；其餘化合物因量少雖未完成送測，然依據其結構特性，初步研判應皆具很強的細胞毒殺

一、計畫緣起：

天然物學者自從 40 年代起開始探索海洋中之天然物，期許浩瀚的海洋所蘊含豐富生物多樣性的寶庫能為人類提供新的藥物。由美國癌症研究中心(NCI)的篩選海洋活性天然物計畫，發現相當高機率的海洋無脊椎動物具有顯著的細胞毒性(cytotoxicity activity, $IC_{50} < 2\mu\text{g/ml}$)，特別是海綿動物(Porifera)、苔蘚蟲(Bryozoa)及脊索動物(Chordata)，其機率遠較陸生動、植物或微生物高¹。事實證明海洋確實給予了新的希望。第一個以海洋天然物為開發基礎用來控制疼痛的藥物已接近上市階段，另有數個朝治療腫瘤用藥的方向開發的海洋天然物亦已進入第二期臨床試驗²；然而大多數由海洋無脊椎動物所獲得之具有藥物開發潛力的化合物，均面臨如何量產的問題，因為並非所有的化合物均可利用人工方法合成，且現階段的人工養殖仍技術上的困難。

近年來的研究發現，這些具有顯著活性的化合物事實上多由與海洋無脊椎動物共生的細菌、真菌、渦鞭毛藻或觸絲藻等微生物所產生³。例如黑海綿(*Halichondria okadae*)所純化出具有高度 protein phosphatase 1 & 2A 抑制活性的 okadaic acid⁴被證實是由底棲性渦鞭毛藻 - 利馬原甲藻(*Prorocentrum lima*)所產生⁵；另在數十年來對熱帶珊瑚礁魚毒之毒源生物的追尋研究中，亦發現相當高比例的底棲性渦鞭毛藻具有活性化合物，且其結構種類十分多樣；Nakajima *et al.* 以 10 種底棲性渦鞭毛藻對老鼠進行活性試驗的結果，發現其中 8 種具有相當高的活性反應⁶；另由與海洋扁蟲(*Amphiscolops magniviridis*)共生，或行自由生活的渦鞭毛藻 *Amphidinium* spp. 中所純化出高達二十多種非常具腫瘤抑制活性的大環內酯(macrolide)化合物 - amphidinolides⁷⁻¹⁰ 及 caribenolide I¹¹ 的研究中，得知 amphidinolide B & N 對於 L1210 及 KB 兩細胞株的 IC_{50} 介於 0.05~0.14ng/ml，而 caribenolide I 對於人類大腸癌細胞株 HCT116 及其抗藥性株 HCT116/VM46，其 IC_{50} 為 1ng/ml；對於老鼠血癌細胞株 P388 的 IC_{50} 更低至 0.03ng/ml。除了渦鞭毛藻外，微藻還包括其他 15 大項的分類別¹²，其大多仍為天然物開發的處女地，可預期其中活性化合物之多樣性；加上微藻的可培養性及穩定性，可輕易克服由海洋無脊椎動物開發藥物所面臨如何量產的問題，為本世紀之海洋之星。

台灣位於熱帶、亞熱帶區，地處大陸棚邊緣，東岸緊臨數千米深的海底峽谷，西岸水深不及百米，因此地形及氣候的多變性及四周洋流，包括東岸的黑潮暖流、西北岸的大陸閩浙沿岸冷水流及西南南海水團，引入不同性質的水團，造就了種歧異度甚高之海洋生態環境；水域中富存著各式各樣的微藻，使得台灣具有優秀的天然環境來從事微藻天然物的研究與開發。本實驗室從事微藻天然物研究多年，所累積分離出之微藻，已有數十藻株分屬於 *Alexandrium minutum*, *Gambierdiscus toxicus*, *Ostreopsis lenticularis*, *Prorocentrum* spp., *Amphidinium* spp. 及 *Gymnodinium* spp. 等被證實具有不同性質、不同程度上的毒性；而同一時、地所分離的不同藻株之活性亦有所不同。

表一、實驗室現有藻株的種類及活性測試結果

渦鞭毛藻

學名	藻株	Hone-1			NUGC			PP-1		
		C ₆ H ₁₄	CH ₂ Cl ₂	BuOH	C ₆ H ₁₄	CH ₂ Cl ₂	BuOH	C ₆ H ₁₄	CH ₂ Cl ₂	BuOH
<i>Alexandrium minutum</i>	Amtk1	1%	2%	104%	6%	1%	122%	72%	97%	69%
	Amtk2	1%	1%	93%	7%	5%	126%	103%	98%	58%
	Amtk3	1%	104%	92%	0%	117%	124%	91%	95%	105%
	Amtk4	106%	107%	79%	107%	125%	119%	92%	102%	62%
	Amtk5	110%	106%	100%	108%	118%	124%	97%	102%	104%
	Amtk6	105%	104%	98%	114%	118%	120%	107%	114%	98%
	Amtk7	110%	105%	96%	112%	119%	122%	88%	98%	91%
	Amks1	124%	127%	109%	99%	106%	103%	104%	101%	90%
	Amks2	103%	103%	49%	114%	117%	107%	91%	94%	37%
	Amks3	102%	102%	99%	120%	122%	122%	60%	92%	92%
	Amks4	106%	104%	99%	115%	121%	122%	106%	102%	74%
Amks5	127%	133%	111%	101%	101%	104%	23%	102%	106%	
<i>Alexandrium tamarense</i>	Athk1	92%	103%	104%	102%	2%	105%	107%	115%	100%
	Athk2	96%	84%	99%	93%	97%	101%	98%	102%	90%
<i>Amphidinium carterae</i>	AC01	90%	88%	94%	11%	3%	1%	42%	32%	42%
	AC02	119%	10%	-1%	102%	2%	0%	50%	39%	37%
	AC03	114%	1%	0%	114%	2%	0%	28%	46%	40%
	AC04	102%	102%	0%	103%	96%	0%	66%	63%	54%
	AC05	110%	104%	0%	98%	109%	1%	42%	48%	49%
	AC06	119%	110%	0%	102%	115%	0%	35%	42%	40%
	AC07	119%	122%	1%	100%	107%	0%	103%	102%	67%
	AC08	55%	110%	32%	108%	117%	2%	58%	77%	71%
	AC09	111%	0%	0%	101%	5%	1%	57%	48%	40%
	AC10	94%	121%	129%	97%	103%	105%	96%	92%	72%
	AC11	121%	90%	88%	121%	121%	118%	104%	106%	111%
<i>Amphidinium klebsii</i>	AK01	78%	96%	0%	100%	117%	0%	40%	50%	51%
<i>Amphidinium</i> spp.	AS01				107%	104%	81%	58%	71%	70%
	AS02				105%	100%	104%	55%	52%	75%
	AS03				104%	97%	102%	75%	73%	82%
	AS04	108%	101%	105%	96%	82%	88%	86%	82%	75%
	AS05				103%	100%	107%	76%	10%	66%
	AS06				105%	104%	103%	23%	64%	69%
<i>Coolia monotis</i>	CM01	107%	52%	109%	99%	52%	112%	57%	52%	39%
	CM02	106%	61%	123%	96%	126%	127%	64%	48%	74%
	CM03	100%	52%	109%	101%	48%	113%	62%	61%	54%
	CM04	110%	62%	116%	96%	72%	113%	106%	103%	46%
	CM05	98%	58%	108%	96%	66%	108%	63%	66%	34%
	CM06	91%	121%	108%	101%	114%	107%	68%	76%	80%
	CM08	103%	89%		99%	86%	108%	77%	75%	68%
	CM09				108%	108%	109%	61%	61%	60%
	CM10	96%	91%	0%	103%	108%	74%	71%	37%	53%
	CM11	95%	129%	111%	114%	104%	103%	83%	76%	16%
	CM15	85%	127%	107%	109%	82%	107%	103%	98%	96%
CM16	119%	1%	107%	100%	0%	104%	98%	99%	89%	
<i>Gambierdiscus toxicus</i>	GT01	94%	1%	93%	112%	1%	109%	88%	95%	10%
	GT05	103%	106%	100%	119%	120%	115%	117%	114%	109%
<i>Gymnodinium catenatum</i>	GCHK01	99%	100%	93%	122%	121%	117%	88%	87%	12%
<i>Gymnodinium</i> sp.	YL01	111%	139%	123%	101%	128%	-107%	72%	56%	66%

續表一

渦鞭毛藻

學名	藻株	Hone-1			NUGC			PP-1		
		C ₆ H ₁₄	CH ₂ Cl ₂	BuOH	C ₆ H ₁₄	CH ₂ Cl ₂	BuOH	C ₆ H ₁₄	CH ₂ Cl ₂	BuOH
<i>Gyrodinium instriatum</i>	GI02				103%	104%	95%	62%	73%	64%
	GI03				104%	103%	109%	78%	67%	80%
<i>Gyrodinium instriatum</i>	GI08				102%	104%	103%	70%	70%	70%
<i>Gyrodinium</i> spp.	GY01	110%	105%	97%	112%	125%	121%	73%	90%	83%
	GY04	82%	11%	113%	37%	-1%	104%	100%	104%	112%
	GY05	126%	130%	113%	107%	102%	105%	65%	76%	72%
<i>Ostreopsis lenticularis</i>	OL01	120%	122%	115%	110%	122%	149%	123%	104%	105%
<i>Ostreopsis</i> spp.	OL02	90%	99%	92%	123%	118%	114%	84%	93%	94%
	OL03	91%	104%	89%	122%	118%	118%	49%	96%	97%
	OL04	98%	102%	94%	123%	114%	115%	94%	91%	90%
	OL05	96%	100%	94%	123%	120%	120%	55%	101%	92%
	OS02	102%	0%	-1%	112%	0%	0%	115%	115%	50%
<i>Prorocentrum lima</i>	PL01	113%	-1%	1%	103%	26%	2%	85%	48%	106%
	PL02	0%	0%	0%	6%	1%	1%	104%	86%	42%
	PL03	0%	4%	4%	1%	2%	3%	106%	10%	75%
	PL04	6%	3%	5%	3%	8%	5%	89%	34%	82%
	PL05	4%	2%	4%	2%	6%	3%	100%	28%	61%
<i>Prorocentrum maxicanum</i>	PM03	123%	121%	107%	102%	121%	117%	77%	72%	60%
<i>Prorocentrum</i> spp.	PE01	102%	79%		104%	87%		88%		
	PL07	98%	1%	2%	118%	1%	1%	66%	63%	31%
	PL08	104%	0%	25%	100%	1%	12%	100%	47%	94%
	PM01				109%	37%	105%	76%	72%	69%
	PM02				103%	95%	103%	60%	62%	68%
	PM04				107%	71%	108%	57%	40%	52%
	PM05				109%	105%	104%	59%	46%	50%
	PM06				103%	77%	108%	70%	57%	46%
	PM07				105%	107%	108%	65%	66%	38%
	PM08	93%	114%	107%	92%	113%	109%	57%	54%	59%
	PM09				107%	93%	104%	40%	47%	66%
	PM10				103%	100%	103%	89%	97%	83%
	PM11				107%	108%	105%	74%	87%	97%
	PM12	72%	-1%	106%	52%	-1%	103%	100%	38%	103%
	PS01	2%	0%	108%	1%	1%	106%	77%	89%	76%
	PS02	3%	3%	4%	3%	7%	4%	82%	28%	18%
	PS03	0%	2%	5%	2%	0%	2%	90%	16%	84%
	PS04	105%	100%	107%	98%	100%	91%	109%	73%	98%
	PS06	110%	-1%	105%	118%	1%	127%	16%	32%	76%
	PS07	113%	-1%	105%	102%	0%	107%	56%	88%	88%
<i>Prorocentrum tropicalis</i>	PT01	110%	2%	105%	99%	81%	107%	87%	95%	102%

藍綠藻

<i>Coelosphaerium</i> sp.	C.TN1	104%	103%	104%	123%	121%	128%	88%	100%	131%
<i>Microcystis aeruginosa</i>	M.TY1	106%	105%	103%	115%	125%	122%	111%	95%	1%
	M.TY2	109%	109%	107%	117%	110%	110%	75%	92%	0%
	M.YL1	110%	109%	108%	120%	122%	124%	112%	100%	86%
	M.CY1	104%	113%	116%	110%	112%	112%	19%	46%	2%
	M.TN1	104%	93%	101%	111%	105%	114%	65%	74%	89%

續表一

藍綠藻

學名	藻株	Hone-1			NUGC			PP-1		
		C ₆ H ₁₄	CH ₂ Cl ₂	BuOH	C ₆ H ₁₄	CH ₂ Cl ₂	BuOH	C ₆ H ₁₄	CH ₂ Cl ₂	BuOH
<i>Microcystis aeruginosa</i>	M.TN2	100%	102%	105%	109%	104%	112%	97%	83%	94%
	M.TN3	100%	104%	105%	114%	105%	113%	59%	56%	88%
	M.TN4	106%	104%	106%	113%	99%	111%	32%	68%	33%
	M.TN5	95%	105%	103%	120%	112%	111%	30%	63%	43%
	M.KS1	105%	104%	111%	117%	102%	111%	65%	78%	64%
	M.KS15	108%	113%	108%	120%	113%	109%	33%	34%	2%
	M.KS29	112%	111%	114%	121%	113%	113%	72%	101%	41%
<i>Oscillatoria</i> sp.	O.TS1	106%	103%	106%	115%	116%	112%	50%	67%	70%
<i>Spirulina</i> spp.	FE-11	83%	104%	102%	101%	96%	109%	88%	85%	88%
品種未知	BG1	1%	97%	95%	2%	108%	113%	106%	109%	113%
	BG2	104%	113%	111%	116%	110%	108%	35%	68%	69%
	BG3	115%	130%	120%	98%	115%	112%	84%	88%	67%
	BG4	118%	146%	119%	101%	111%	106%	95%	89%	101%
	BG5	118%	132%	112%	99%	101%	106%	87%	91%	99%
	BG6	95%	88%	94%	110%	113%	115%	113%	114%	112%
	BR1	104%	98%	94%	102%	110%	113%	92%	96%	92%
	BR2	104%	98%	94%	98%	99%	102%	99%	95%	85%
	BR3	97%	93%	99%	110%	114%	119%	109%	117%	110%
	BR4	98%	98%	95%	114%	113%	117%	110%	111%	109%
	CG1	100%	99%	98%	104%	112%	116%	90%	96%	90%
	CG2	106%	97%	89%	100%	109%	109%	110%	112%	96%
	CG3	96%	95%	102%	101%	102%	93%	91%	13%	93%
	CR1	98%	91%	98%	104%	112%	110%	106%	105%	111%
	CR2	99%	94%	97%	108%	106%	117%	126%	103%	104%
	CR3	93%	90%	95%	103%	5%	119%	100%	106%	107%
	CR4	97%	99%	99%	115%	116%	120%	115%	112%	111%
CR5	98%	99%	99%	108%	114%	118%	33%	51%	79%	
OS1	96%	96%	102%	113%	119%	125%	88%	102%	106%	

定鞭藻

<i>Prymnesium parvan</i>	PP1	29%	130%	117%	47%	113%	105%	96%	92%	93%
--------------------------	-----	-----	------	------	-----	------	------	-----	-----	-----

綠藻

<i>Dunaliella</i> sp.		58%	52%	105%	102%	111%	63%	104%	110%	94%
-----------------------	--	-----	-----	------	------	------	-----	------	------	-----

矽藻

品種未知	CF3	102%	98%	101%	108%	114%	120%	110%	105%	108%
	G2	94%	99%	99%	133%	118%	123%	110%	110%	119%
	MP1	102%	103%	103%	108%	112%	116%	99%	104%	114%
	MP2	102%	100%	102%	111%	111%	109%	102%	107%	102%

紅藻絲狀體

<i>Bangia atropurpurea</i>	BA01	123%	119%	105%	104%	101%	108%			
<i>Galaxaura oblongata</i>	GO01	110%	122%	106%	110%	108%	98%			

續表一

紅藻絲狀體

學名	藻株	Hone-1			NUGC			PP-1		
		C ₆ H ₁₄	CH ₂ Cl ₂	BuOH	C ₆ H ₁₄	CH ₂ Cl ₂	BuOH	C ₆ H ₁₄	CH ₂ Cl ₂	BuOH
<i>Halymenia ceylanica</i>	HC01	117%	125%	111%	105%	111%	112%	25%	27%	40%
	HC02	109%	129%	105%	99%	108%	88%	30%	45%	39%
<i>Helminthocladia australis</i>	HA01	116%	121%	107%	116%	114%	104%			
<i>Liagora orientalis</i>	LO01	121%	117%	112%	112%	100%	98%			
<i>Porphyra angusta</i>	PA01	123%	119%	105%	104%	101%	108%			
<i>Scinaria moniformis</i>	SM01	115%	121%	111%	114%	114%	107%			

類	屬名	總株數	送測數	癌細胞毒殺活性數*				PP-1 抑制活性數**			
				株數	己烷層	氯仿層	丁醇層	株數	己烷層	氯仿層	丁醇層
渦鞭藻	<i>Alexandrium</i>	15	14	4	3	3	0	1	1	0	0
	<i>Amphidinium</i>	18	18	10	1	4	10	3	2	1	0
	<i>Coolia</i>	12	12	2	0	1	1	1	0	0	1
	<i>Gamdiardiscus</i>	2	2	1	0	1	0	1	0	0	1
	<i>Gymnodinium</i>	2	2	0	0	0	0	1	0	0	1
	<i>Gyrodinium</i>	6	6	1	0	1	0	0	0	0	0
	<i>Ostreopsis</i>	6	6	1	0	1	1	0	0	0	0
	<i>Prorocentrum</i>	27	27	14	5	13	9	5	1	3	1
藍綠藻	<i>Coelosphaerium</i>	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Microcystis</i>	12	12	0	0	0	0	8	3	0	7
	<i>Oscillatoria</i>	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Spirulina</i>	32	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	Unidentified	19	19	2	1	1	0	2	1	1	0
矽藻	Unidentified	5	4	0	0	0	0	0	0	0	0
定鞭藻	<i>Prymnesium</i>	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
綠藻	<i>Dunallina</i>	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
小計		160	127	35	10	25	21	22	8	5	11

種類	屬名	總株數	送測數	癌細胞毒殺活性數*				PP-1 抑制活性數**			
				株數	己烷層	氯仿層	丁醇層	株數	己烷層	氯仿層	丁醇層
紅藻	<i>Bangia</i>	5	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Galaxaura</i>	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Grateloupia</i>	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Helminthocladia</i>	4	2	0	0	0	0	2	2	1	0
	<i>Halymenia</i>	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Liagora</i>	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Porphyra</i>	4	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Pterocledia</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Scinaria</i>	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	Unidentified	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0
褐藻	<i>Ectocarpus</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
* Survival rate < 10% control		34	8	0	0	0	0	2	2	1	0
** Activity < 30% control 總計		194	135	35	10	25	21	24	10	6	11

活性。而 *Amphidinium* 藻株部份則已由 AC09 藻株純化出 12 個化合物，及 AC06 藻株純化出兩個化合物(圖三)；經初步鑑識已知 AC09 的 butanol 層中的化合物為 tryptophan 及 amphidinol，AC06 的則為其他兩種不同的 amphidinols，其餘化合物則因結構複雜或總量不足，至今仍未完成所有結構的解析。目前正持續加強專業人員的補強，以期在最短時間內完成這部份的進度。在國外文獻中 Amphidinols 具有極強的細胞毒殺活性，因此在完成所有細部結構解析後，將速送國衛院進行活性測試，並考慮另行測試其對其他癌細胞株的細胞毒殺活性。雖然本類化合物具有成為抗癌藥物的潛力，然由於其結構過於複雜，因此短期內將不列入人工合成的考量。

在 protein phosphatase 抑制活性法的開發應用部份，利用先前所完成的分析標準模式，進行所有曾經送測國衛院藻株分液測試的結果，發現有來自 24 株藻的 27 個 fractions 具有顯著的抑制活性(表一)。由於源自藻類的 phosphatase inhibitors 種類不多，因此將確認這些未知成份是否為 new compounds，同時比較酵素抑制活性與抗癌活性間之關連。

2. 執行計畫期限預期完成之工作項目及時程：

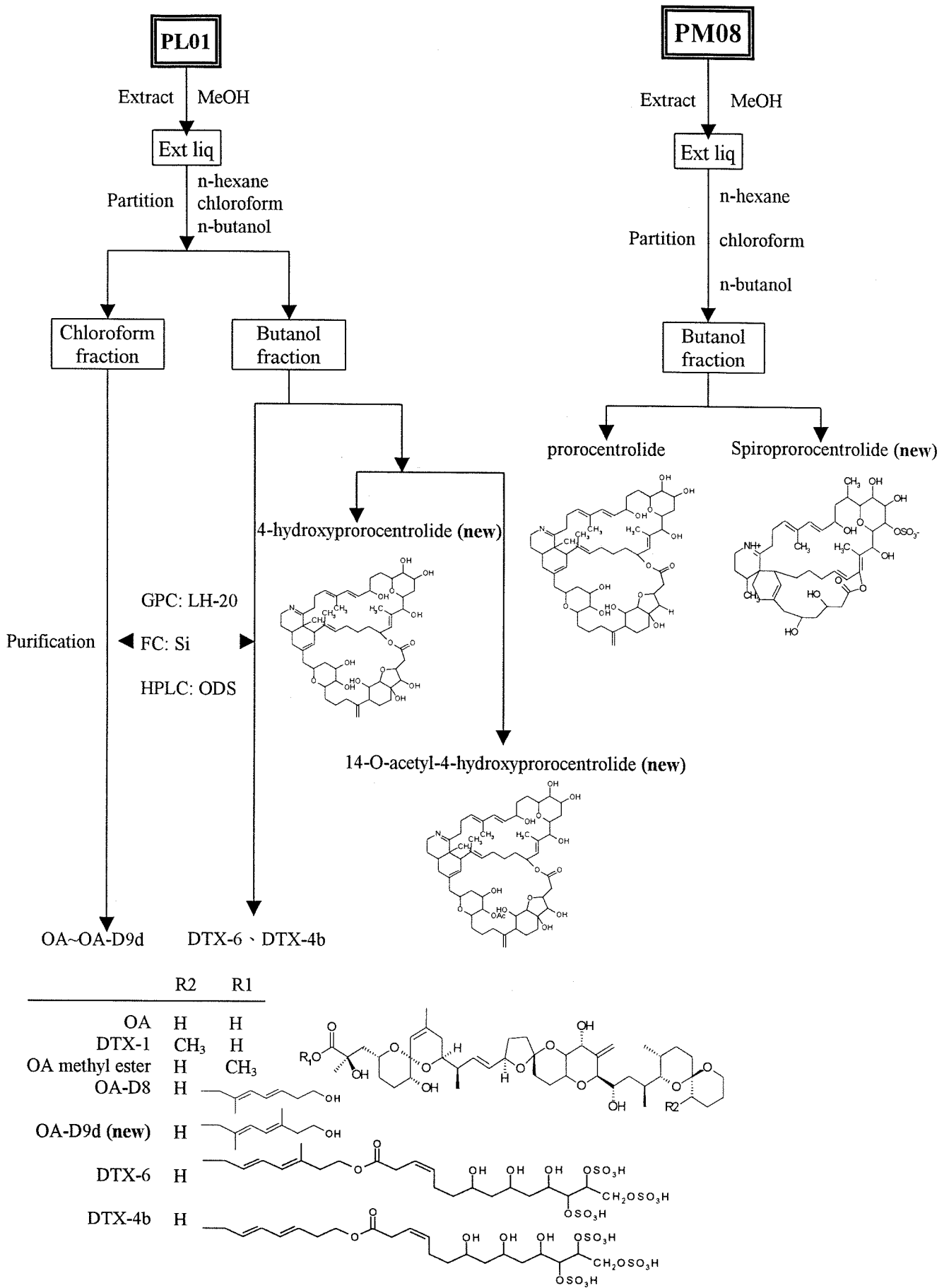
第一年計畫以進行初步活性篩檢為主要工作訴求。由於實驗室所負責的微細藻部份則受藻株挑取成功率低、現有培養方法不適用及擴充至送測規模須較長時間等不利因子限制，至今仍未完成所有藻株的送測；此外年度內尚須建立 protein phosphatase 活性抑制法的標準操作模式；第二年持續進行藻株的挑取及藻株生長條件的測試，並針對特定藻株進行大規模培養。化合物純化及鑑定部份則在三年內應完成 20 種以上新化合物的純化與結構鑑定，同時完成抗癌活性的分析；資料庫及 protein phosphatase 的活性篩檢工作亦應於本年度內執行完畢。第三年除延續特定藻株的大規模培養及純化、鑑定具有活性的化合物，並進行結構與活性關連之探討外，尚須完成 prorocentrolide 的生合成研究，以為後續全人工合成法的參考。

3. 是否達成進度？如進度落後，請說明原因：

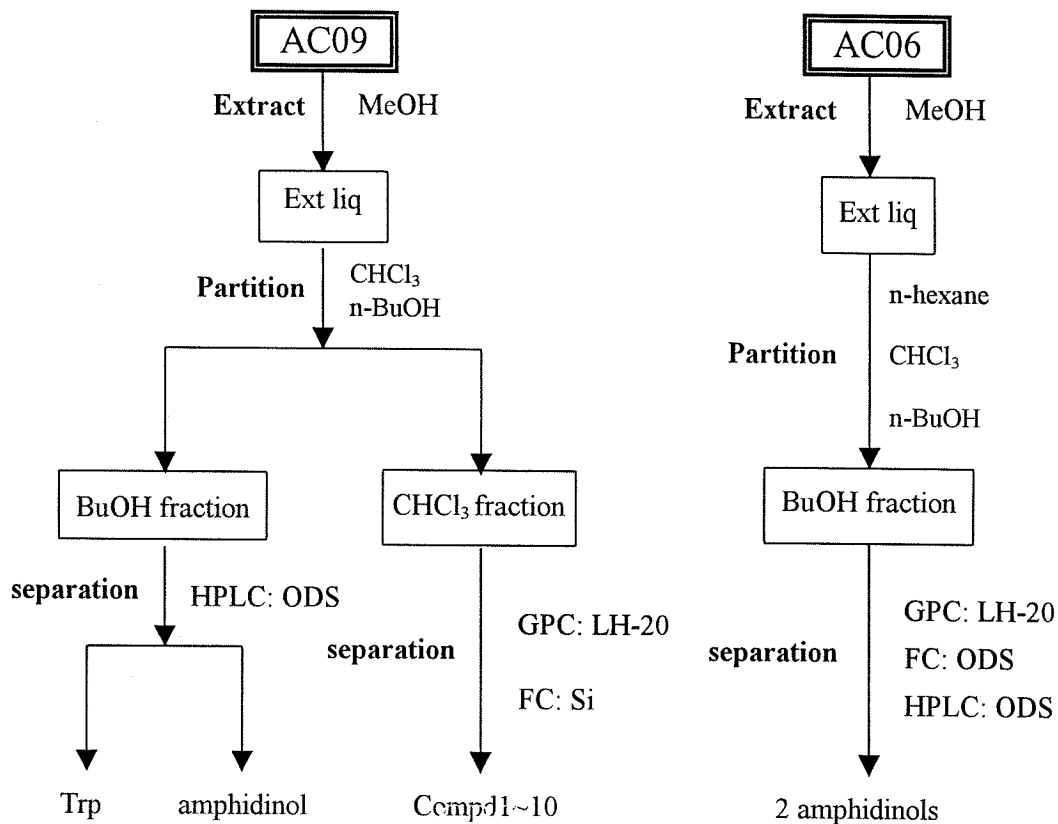
目前微細藻的種源庫已建立的十分完備，舉凡藻株的種類、數量及維持均達一定水準，目前擬另行對所有藻細胞株進行拍攝，建立藻類圖片的資料庫。藻株的活性篩檢部份仍持續培養送測中，預定在年底前可完成所有現有藻株的測定；Protein phosphatase 抑制活性的篩檢將與國衛院樣品的送測同步進行。另在化合物純化鑑定的工作部份，除將陸續完成所有已純化化合物的結構及活性分析外，另擬進行其他藻株，包括 *Alexandrium* 之 Amtk-2 及 *Ostreopsis* 之 Os-02 進行活性物質的純化，在進度上大抵符合原計畫書之預期。

4. 預算執行情形：

本年度儀器設備費所編列的恆溫培養箱已依採購法完成採購；人事費及其他雜支結算四月底為止已分別報支 85% 及 90%，符合預算使用進度。



圖二、*Procentrum* 藻株之化合物純化流程及結構鑑定結果



圖三、Amphidinium 藻株之化合物純化流程

參考文獻：

1. Garsen, M. J., 1994. The biosynthesis of sponge secondary metabolites: why it is important. In: van Soest, R. W. M., van Kempen, T. M. G., Breakman, J. C. (Eds.), *Sponges in time and space*. Balkema, Rotterdam, pp.427-440.
2. Murray, H. G., Blunt, J. W., Dumdei, E. J., Hickford, S. J. R., Lill, R. E., Christopher, C. N. and Duckworth, A. R., 1999. The discovery and development of marine compounds with pharmaceutical potential. *J. Biotech.*, 70:15-25.
3. Kobayashi, J. I. and Ishibashi, M., 1993. Bioactive metabolites of symbiotic marine microorganism. *Chem. Rev.*, 93:1753-1769.
4. Tachibana, K., Sheuer, P. J., Tsukitani, H., van Engen, D., Clardy, J., Gopichand, Y. and Shmitz, F. J., 1981. Okadaic acid, a cytotoxic polyether from two sponges of the genus *Halichondria*. *J. Am. Chem. Soc.*, 103:2469-2471.
5. Murakami, Y., Oshima, Y. and Yasumoto, T., 1982. Identification of okadaic acid as a toxic component of marine dinoflagellate *Prorocentrum lima*. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 48: 69-72.
6. Nakajima, I., Oshima, Y. and Yasumoto, T., 1981. Toxicity of benthic dinoflagellates in

- Okinawa. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 47: 543-572.
7. Ishibashi, M. and Kobayashi, J. I., 1997. Amphidinolides: unique macrolides from marine dinoflagellates. *Heterocycles*, 44: 543-572.
8. Tsuda, M., Endo, T. and Kobayashi, J. I., 1999. Amphidinolide U, noval 20-membered macrolide from marine dinoflagellate *Amphidinium* sp.. *Tetrahedron*, 55: 14565-144570.
9. Kubota, T., Tsuda, M. and Kobayashi, J. I., 2000. Amphidinolide V, noval 14-membered macrolide from marine dinoflagellate *Amphidinium* sp.. *Tetrahedron Lett.*, 41: 713-719.
10. Tsuda, M., Endo, T. and Kobayashi, J. I., 2000. Amphidinolide T, noval 19-membered macrolide from marine dinoflagellate *Amphidinium* sp.. *J. Org. Chem.*, 65: 1349-1352.
11. Bauer, I., Maramba, L., Young, K. A. and Shimizu, Y., 1995. Isolation and structure of caribenolide I, a high potent antitumor macrolide from a dinoflagellate, *Amphidinium* sp. S1-36-5. *J. Org. Chem.*, 60: 1084-1086.
12. South, G. R. and Whittick, A., 1987. Introduction to phycology. Blackwell Scientific Publication, pp. 5-9.