

行政院國家科學委員會專題研究計畫 期末報告

探討真菌免疫調節蛋白的醣類結合模組在誘發人類周邊單核球細胞產生干擾素 γ 作為減緩氣喘之健康食品的應用

計畫類別：個別型
計畫編號：NSC 101-2320-B-040-011-
執行期間：101年08月01日至102年07月31日
執行單位：中山醫學大學生物醫學科學學系（所）

計畫主持人：劉玉凡
共同主持人：柯俊良
計畫參與人員：碩士級-專任助理人員：朱伯威
碩士級-專任助理人員：林欣穎
大專生-兼任助理人員：邱于安
大專生-兼任助理人員：李庭瑀

報告附件：出席國際會議研究心得報告及發表論文

公開資訊：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

中華民國 102年10月28日

中文摘要： FIP-fve 為一種從金針菇 (*Flammulina velutipes*) 純化出來的免疫調節蛋白，具有刺激人類週邊血單核球細胞產生干擾素- γ 的活性，從蛋白質 3D 結構的比對，發現 FIP-fve 的醣類結合模組與澱粉結合區的醣類結合模組相類似，澱粉具有破壞 FIP-fve 刺激人類週邊血單核球細胞產生干擾素- γ 的效果。本實驗藉由 ELISA 實驗觀察人類週邊血單核球細胞分泌干擾素- γ 的情形。本期研究報告證明 starch、dextrin, cyclodextrin, maltotriose, maltose 與 neuraminic acid 具有抑制由 FIP-fve 刺激而分泌的干擾素- γ 。雖然這些醣類可以抑制干擾素- γ 的分泌，但由 FIP-fve 刺激造成人類週邊血單核球細胞聚集的狀況卻不受影響。接著採用點突變的方式產生突變的 FIP-fve (W26G, D36G, T92A, I93A, W113G)，破壞 FIP-fve 結構中預測與醣類之結合位置，並以 ELISA 與凝血測試分析這些突變 FIP-fve 的蛋白活性，FIP-fve 的醣類結合位經突變後，造成其免疫調節活性作用降低。突變的 FIP-fve(T30N)，並沒有改善其刺激人類週邊血單核球細胞產生干擾素- γ 的活性。此外，對人類週邊血單核球細胞處理 tunicamycin 與去醣化酵素也會減少干擾素- γ 分泌量。綜合以上實驗結果，干擾素- γ 的產生與 FIP-fve 的醣類結合模組和人類週邊血單核球的醣化受器具有相關聯。

中文關鍵詞： 真菌免疫調節蛋白、醣類結合模組、蛋白質與醣類交互作用、干擾素 γ

英文摘要： FIP-fve is a protein that is isolated from *Flammulina velutipes*. Its known immunomodulatory activities are elicitation of the production of type II interferon from human peripheral mononuclear cells (hPBMCs) and hemagglutination. How the target receptors mediate activation of FIP-fve-induced immunomodulatory effects remains to be elucidated. This study postulates the three-dimensional structures to determine whether the carbohydrate binding module family 34 (CBM-34) on FIPfve is conserved to site N of *Thermoactinomyces vulgaris* R-47 α -amylase I. Experimental site-directed mutagenesis data as well as ligand-specific binding competition assay are adopted to identify the key residues W24, T28, D34, T90, I91, and W111 of FIP-fve that participate in binding to polysaccharides that are linked to the membrane of immune cells. Treatments of hPBMCs with

tunicamycin and deglycosylation enzymes that removed the carbohydrate moieties reduced the secretion of IFN- γ induction from hPBMCs. In conclusion, the experiments herein demonstrated the ligand-binding CBM-34 on FIP-fve and ligand-like glycoproteins on the surface of hPBMCs must be required to induce physiological immunomodulatory effects.

英文關鍵詞： fungal immunomodulatory protein, FIP, carbohydrate binding site, protein-carbohydrate interaction, IFN- γ ,

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫

期中進度報告
期末報告

探討真菌免疫調節蛋白的醣類結合模組在誘發人類周邊單核球細胞產生干擾素 γ 作為減緩氣喘之健康食品的應用

計畫類別：個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 101-2320-B-040-011-

執行期間：101年8月1日至102年7月31日

執行機構及系所：中山醫學大學 生物醫學科學學系

計畫主持人：劉玉凡 副教授

共同主持人：柯俊良 教授

計畫參與人員：朱柏威、林欣盈（碩士級專任助理）、
邱于安、李庭瑀（大學部兼任助理）

本計畫除繳交成果報告外，另含下列出國報告，共 1 份：

移地研究心得報告

出席國際學術會議心得報告

國際合作研究計畫國外研究報告

處理方式：除列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權，一年 二年後可公開查詢

中 華 民 國 102 年 10 月 29 日

(二) 中文摘要

FIP-fve 為一種從金針菇 (*Flammulina velutipes*) 純化出來的免疫調節蛋白，具有刺激人類週邊血單核球細胞產生干擾素- γ 的活性，從蛋白質 3D 結構的比對，發現 FIP-fve 的醣類結合模組與澱粉結合區的醣類結合模組相類似，澱粉具有破壞 FIP-fve 刺激人類週邊血單核球細胞產生干擾素- γ 的效果。本實驗藉由 ELISA 實驗觀察人類週邊血單核球細胞分泌干擾素- γ 的情形。本期研究報告證明 starch、dextrin, cyclodextrin, maltotriose, maltose 與 neuraminic acid 具有抑制由 FIP-fve 刺激而分泌的干擾素- γ 。雖然這些醣類可以抑制干擾素- γ 的分泌，但由 FIP-fve 刺激造成人類週邊血單核球細胞聚集的狀況卻不受影響。接著採用點突變的方式產生突變的 FIP-fve (W26G, D36G, T92A, I93A, W113G)，破壞 FIP-fve 結構中預測與醣類之結合位置，並以 ELISA 與凝血測試分析這些突變 FIP-fve 的蛋白活性，FIP-fve 的醣類結合位經突變後，造成其免疫調節活性作用降低。突變的 FIP-fve(T30N)，並沒有改善其刺激人類週邊血單核球細胞產生干擾素- γ 的活性。此外，對人類週邊血單核球細胞處理 tunicamycin 與去醣化酵素也會減少干擾素- γ 分泌量。綜合以上實驗結果，干擾素- γ 的產生與 FIP-fve 的醣類結合模組和人類週邊血單核球的醣化受器具有相關聯。

(二) 英文摘要

FIP-fve is a protein that is isolated from *Flammulina velutipes*. Its known immunomodulatory activities are elicitation of the production of type II interferon from human peripheral mononuclear cells (hPBMCs) and hemagglutination. How the target receptors mediate activation of FIP-fve-induced immunomodulatory effects remains to be elucidated. This study postulates the three-dimensional structures to determine whether the carbohydrate binding module family 34 (CBM-34) on FIP-fve is conserved to site N of *Thermoactinomyces vulgaris* R-47 α -amylase I. Experimental site-directed mutagenesis data as well as ligand-specific binding competition assay are adopted to identify the key residues W24, T28, D34, T90, I91, and W111 of FIP-fve that participate in binding to polysaccharides that are linked to the membrane of immune cells. Treatments of hPBMCs with tunicamycin and deglycosylation enzymes that removed the carbohydrate moieties reduced the secretion of IFN- γ induction from hPBMCs. In conclusion, the experiments herein demonstrated the ligand-binding CBM-34 on FIP-fve and ligand-like glycoproteins on the surface of hPBMCs must be required to induce physiological immunomodulatory effects.

(二) 關鍵詞

真菌免疫調節蛋白、醣類結合模組、蛋白質與醣類交互作用、干擾素 γ 。

(三)報告內容：

I、前言

高醫環境醫學頂尖研究中心葛應欽教授對於氣喘篩檢定義與診斷的報告中，指出氣喘與氣道發炎間的關係，然而世界衛生組織又添加進**免疫細胞**的角色，尤其對於**肥大細胞(Mast cell)**，**嗜伊紅細胞(eosinophils)**，及**T淋巴球**，顯示氣喘是屬於慢性發炎現象 (Wang et al., 2006)。同時，在2006年針對台灣小孩氣喘與關聯性基因的研究中，提到IFN- γ 與IRF-1基因的多型性(Polymorphisms)，**影響Th1/Th2 Cytokines 平衡**，進而促進**Th2細胞的分化及氣喘的發生**(Wang et al., 2006)。另一方面，中山醫學大學臨床醫學所柯俊良教授長期對於**菇類免疫調節蛋白**的研究，該蛋白屬於一種具有血球凝集活性的物質，在微生物及動、植物中皆有發現，存於菇類的凝集素，又可區分為對糖具有專一性的親糖蛋白(mushroom lectins)、不具糖類專一親和性的**真菌免疫調節蛋白(fungal immunomodulatory protein, FIP)**及糖蛋白凝集素，具調節免疫系統及抑制腫瘤的活性，可發展為**減緩氣喘藥物與健康食品**的潛力。

II、研究目的

目前研究**真菌免疫調節蛋白**經由餵食小鼠的實驗方式，證實有效成分具有**通過胃壁以及被小腸吸收的能力**(Hsieh et al., 2003) (Fig.8D)。同時，**真菌類免疫調節蛋白**可使正常人類週邊血液的淋巴球(HPBMCs)以及Balb/c老鼠的脾臟細胞藉由**Proinflammation cytokines 路徑**來誘發IFN- γ 的產生 (Lin et al., 2009)，IFN- γ 是屬於Th1細胞所誘發的細胞激素，可抑制Th2細胞所產生的細胞激素。因此，IFN- γ 在免疫系統上，具有降低由Th2細胞調控IgE、mast cell、eosinophils等所引起的過敏反應，包括慢性氣喘及呼吸道發炎等免疫疾病。有鑑於此，**真菌免疫調節蛋白**能夠調節(或恢復)體內**Th1/Th2 免疫反應的拮抗作用**，有機會能夠透過飲食減緩氣喘的發生，進而達到預防過敏性疾病的目標。

III、研究方法

在本計畫前置實驗中的初步資料顯示，利用糖類ligand的競爭方法、建構缺失性突變重組蛋白等實驗，來探討**FIP-fve**對於誘發IFN- γ 以及轉錄因子**T-bet**表現情形(Fig.11)，說明糖類的交互作用與訊息調控的路徑習習相關。雖然，初步利用七種常見單糖、雙糖及其磷酸化的衍生物作為糖類ligand競爭，無法改變**FIP-fve**誘發IFN- γ 的作用，但是以多糖類(如: Starch)在5 mg/ml的濃度下卻達到約**50%與ligand競爭的作用能力**，同時也不會影響到細胞的死亡情形；並且在缺失性突變重組蛋白的實驗中，失去血液凝集的能力，同時也會喪失誘發IFN- γ 的作用，兩項結果也說明FIP-fve與糖類的交互作用，對於調節免疫系統扮演關鍵的角色。

IV、結果與討論

以生物資訊學的結構分析為基礎，進行**FIP-fve**上的糖類結合模組(Carbohydrate Binding Module, CBM)的鑑定。初步的結果，在CAZY資料庫中與第34型糖類接合模組的二級結構組成十分類似，雖然此類型的蛋白具有兩個截然不同的糖類辨識區，但是其中與**多糖類結構**可產生交互作用的**site-N**

結構，在幾個關鍵氨基酸在空間方位上皆與 FIP-*fve* 具有高度的保留性，相關的實驗工作內容，是利用學理性點突變的方式來建構重組蛋白及多醣類 ligands 競爭的模式，來探討 FIP-*fve* 上醣類結合模組關鍵氨基酸及多醣類 ligands 結構間的交互作用。

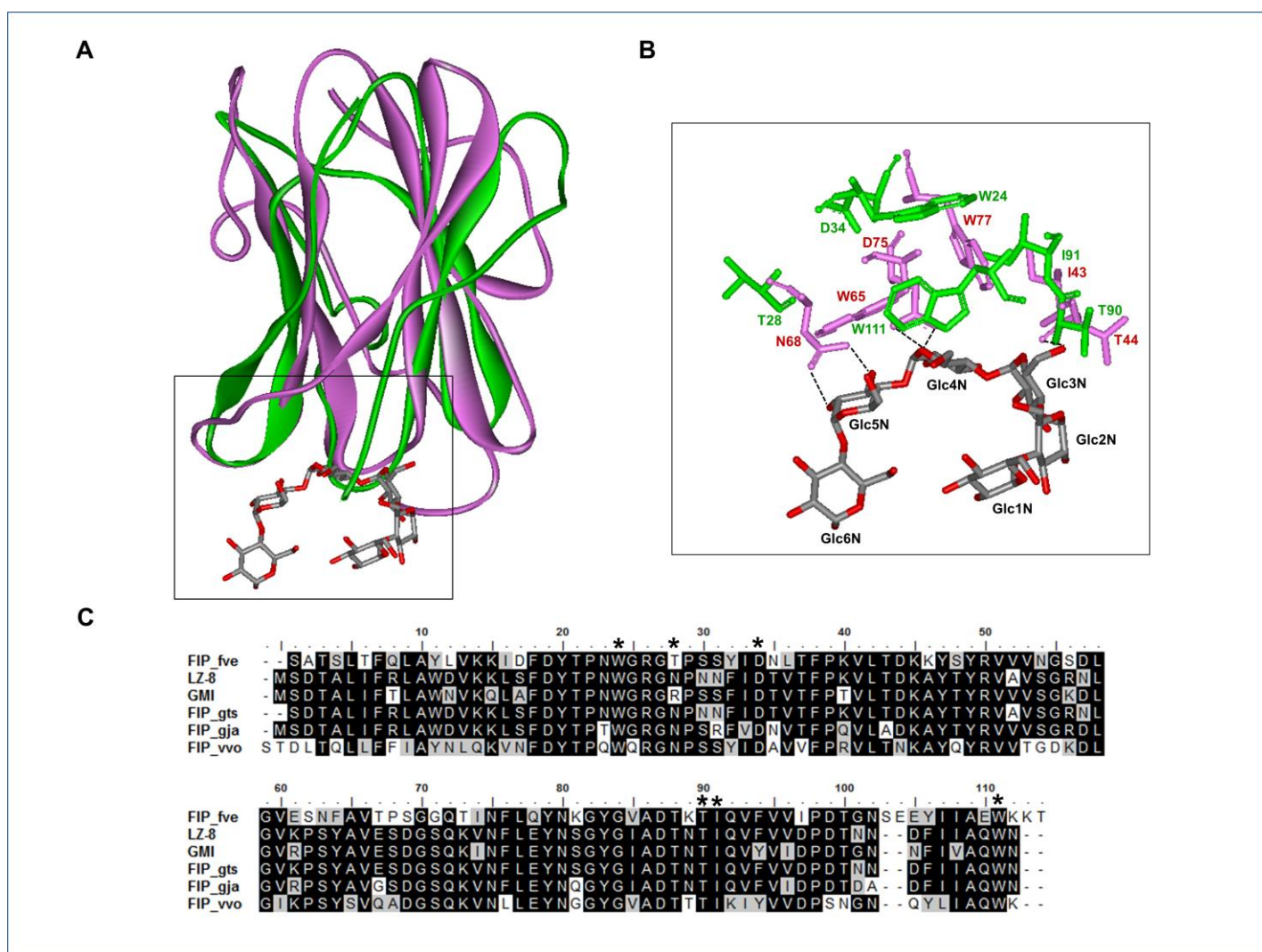


Figure 1 Overall structural comparison between Ig-like domain of FIP-*fve* and domain N of *T. vulgaris* R-47 α -amylase I (A) Schematic X-ray structures of FIP-*fve* molecule (green, PDB code 1OSY) with domain N of *T. vulgaris* R-47 α -Amylase I (red, PDB code 1UH4). Molecules overlapped in the folds of Ig-like structures, as determined using the “magic fit” algorithm of the SwissPDB viewer program³¹. The box represents the interaction between granule starch and CBM-34 of α -amylase I. The CBM-34 structure on FIP-*fve* and TVAI α -amylase comprises residues 15 to 114 and 1 to 121, respectively. The AccelrysTM ViewerLite 5.0 program was used to render the modeled structure. (B) Closed-view of interactions between granule starch molecule (wire-style model) and molecular surface saccharide-binding site residues of Ig-like domain of FIP-*fve* and domain N of TVAI α -amylase are numbered, and shown as green and red sticks, respectively, in a similar orientation as to that in (A). Selected hydrogen-bonding interactions between substrates and CBM-34 are marked as dotted lines. (C) Multiple sequence alignments of FIP-*fve* (P80412), LZ-8 (P14945), GMI (3KCW), FIP-*gts* (AA33350), FIP-*gja* (AAX98241) and FIP-*vvo* was calculated using the program CLUSTALW³². Numbers above sequences correspond to FIP-*fve*. Asterisks (*) indicate key residues that involved carbohydrate binding module. This figure was created using BioEdit program, identical amino acids are represented by black shading and similar amino acids are represented by gray shading

既然，真菌類免疫調節蛋白會進到 hPBMCs 的細胞質，是透過細胞膜上某種的醣類分子或接受器，使 FIP-fve 進入到免疫細胞內，促進免疫細胞的生長與功能的變化。FIP-gts、FIP-fve 本身又屬於植物凝集素(Lectin)的一種，而 Lectin 為植物凝集素，也是一種醣類結合蛋白，一般具有兩個醣結合位置，靠其上的醣類與細胞表面結合，並有傳輸細胞外蛋白的功能 (Hauri et al., 2000)，根據 1998 年 Blanchard 等人利用 Mannose-6-phosphate, Galactose, Mannose, Glucose and Glucose-6-phosphate 5 種醣類及衍生物，尋找到 glycosylated human leukemia inhibitory factor 在細胞膜上的接受器為 mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor (Blanchard et al., 1998)，結合後進行 endocytosis 進入細胞，所以想瞭解此類蛋白會透過細胞膜上的何種醣類或接受器進入到細胞內，進而促進 IFN- γ 的產生，故利用不同醣類及其磷酸化醣類與 FIP-fve 競爭 HPBMC 細胞膜上的接受器，阻礙其進到細胞內而造成無法刺激 IFN- γ ，推論出 FIP-fve 是透過何種醣類 ligand 進到細胞內，利用七種單醣、雙醣及其磷酸化醣類作為醣類 ligand 的競爭者，無法改變 FIP-fve 所誘發 IFN- γ 的活性，顯示 FIP-fve 並不是與一般 Lectins 一樣是利用細胞膜接受器 mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor

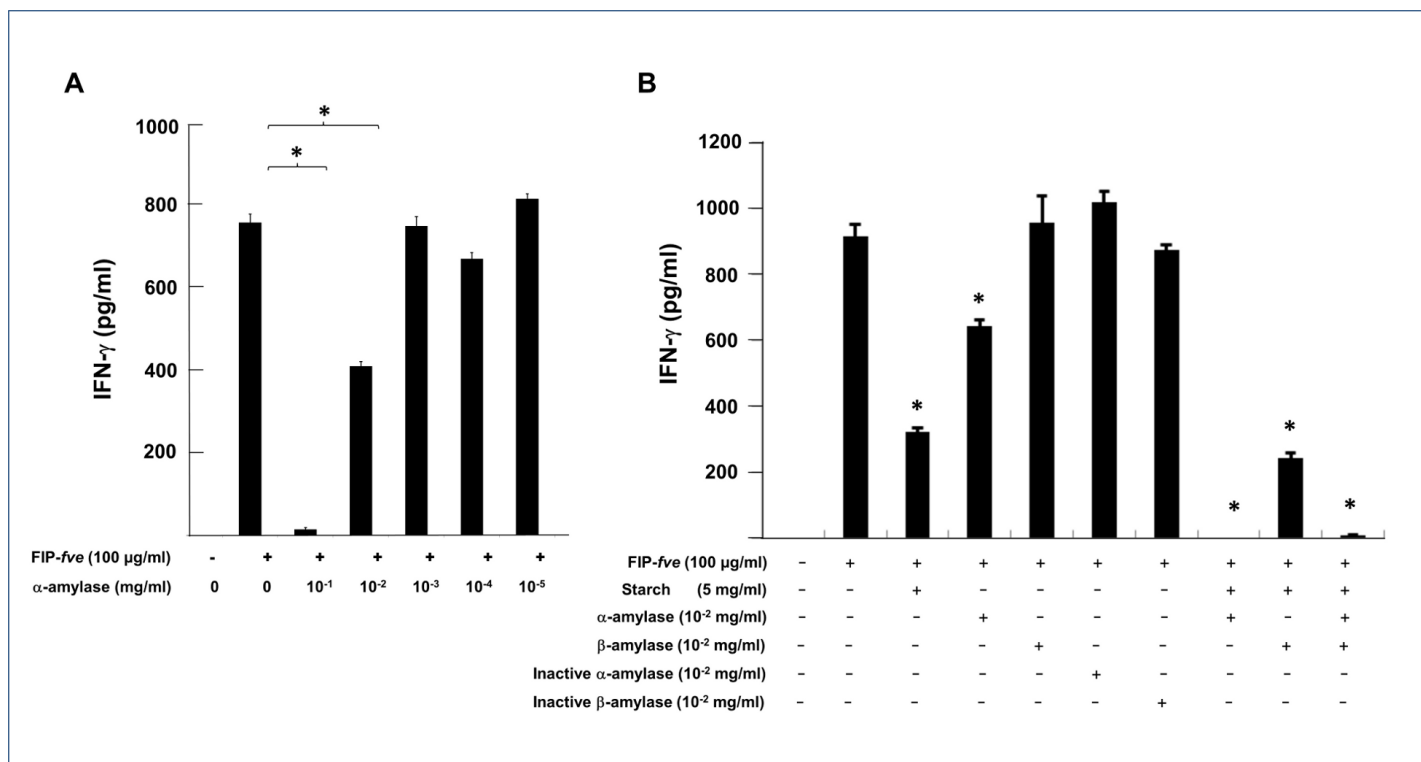


Figure 2 Effects of starch, α -amylase and β -amylase on native FIP-fve induced secretion of IFN- γ in hPBMCs. Cultured hPBMCs (2×10^6 cells/ml, 1 ml/well) were co-treated with native FIP-fve (100 μ g/ml) and various concentrations of (A) α -amylase (serial dilutions from 0 to 10^{-5} mg/ml) and (B) were treated w/o active or autoclaved inactive of α - and β -amylase (0.01 mg/ml) or w/o starch (5 mg/ml) in RPMI 1640 that had been supplemented with 5% FBS for 48 h. Conditioned media were subjected to ELISA to measure amounts of secreted IFN- γ . Vehicle controls using distilled water data represented at each lane one. The data are represented mean \pm S.D. from triplicate experiments. Asterisks (*) on top indicates a significant difference from the control group with a calculated $P < 0.05$.

根據前面實驗所建構重組 reFIP-fve 蛋白以及相關缺失性突變的資料都顯示，除了完整序列的重組 reFIP-fve 還具有紅血球凝集的能力，其他的缺失突變的 reFIP-fve 都失去了紅血球的凝集能力；另一方面，去除 C-端 10 氨基酸的缺失性突變 re-FIP-fve 1-103 重組蛋白，仍保有 native FIP-fve 部分的活性，可以刺激 HPBMCs 產生 IFN- γ ，顯示除了與細胞膜上的醣類 ligands 結合，而進入細胞來誘發免疫調節

反應的機制外，可能還有另一條藉由蛋白質與多醣類的結合方式，來調節免疫作用的路徑。因此，從 Lin 等人在 2009 年的研究中發現，使用對於 TLR4/MD-2 接受器的中和性抗體，可以降低由 rLZ-8 所誘發 DCs 細胞成熟，並且所抑制分泌的 IL-12 p40 及 IL-10 等細胞激素，以及由 TLR4 或 TLR4/MD-2 所建構的 HEK293 細胞可受到 rLZ-8 的刺激產生 IL-8 的分泌，這些結果都顯示 TLR4/MD-2 接受器是 rLZ-8 所誘發 DCs 活化的路徑上是扮演重要的角色。

除了找尋菇類的免疫調節蛋白進入免疫細胞的接受器及可能的機制外，最近也有研究報導人類 TLR4/MD-2 本身就屬於一種醣蛋白受體，經質譜分析的結果該受體上的醣類分子，包含：N-linked high-mannose type (Fig5B) 以及 complex type (Fig.5C) glycans (Nishitani et al., 2009)，為了探討 FIP-fve 的醣類結合模組，是否是直接來藉由與 TLR4/MD-2 上的多醣類交互作用？來活化 TLR4/Md-2 的訊息路徑，這部份實驗設計是採用免疫沉澱法、染色法及 pull-down 的方法，進一步來說明 FIP-fve 與 TLR4/MD-2 上何種的 glycans 交互作用，是活化免疫調節訊息所必要的過程。

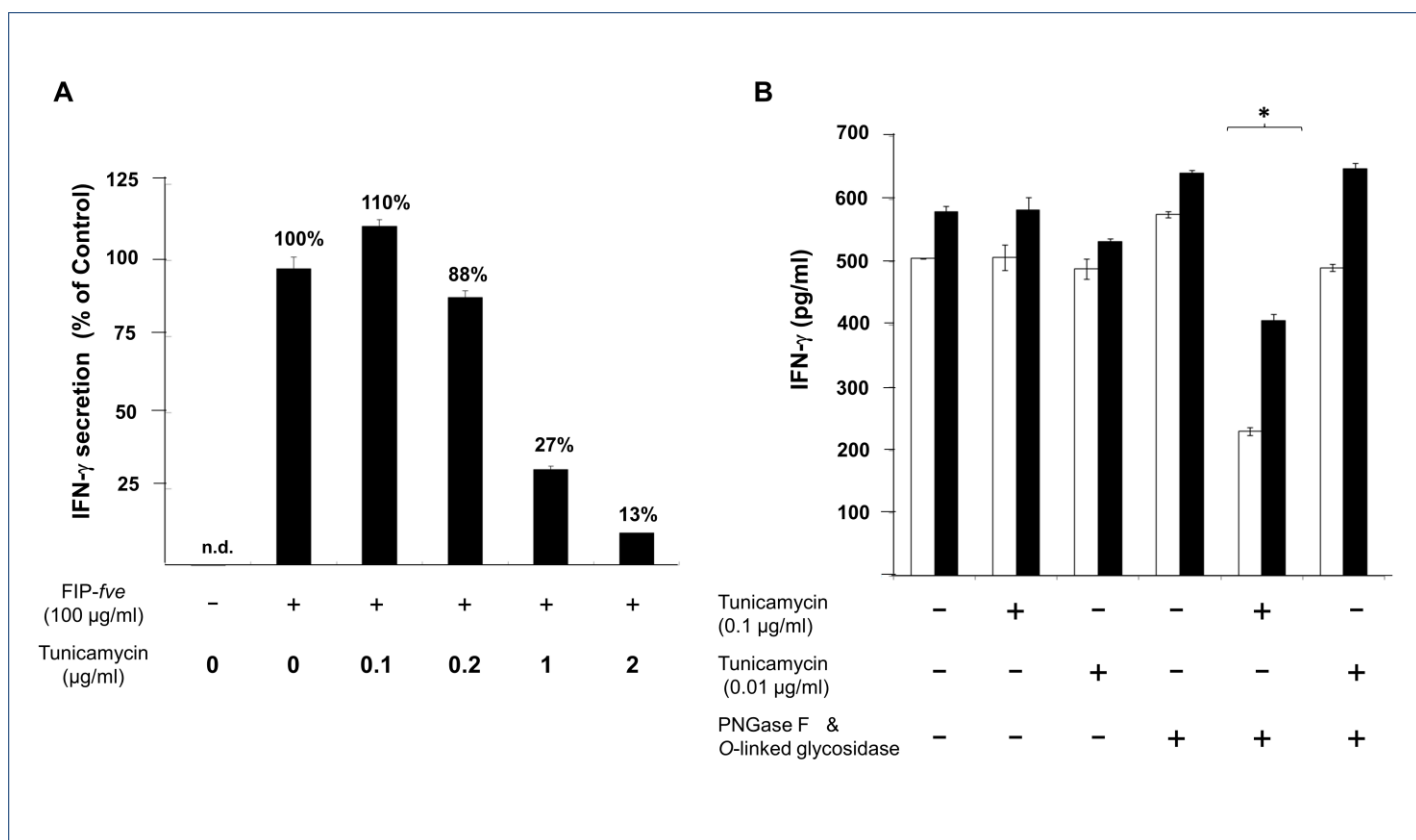


Figure 3 Effects of tunicamycin, O-linked glycosidases or PNGase F on native FIP-fve induced secretion of IFN-γ in hPBMCs. (A) hPBMCs (2×10^6 cells/ml, 1 ml/well) were treated with native FIP-fve (100 µg/ml) as 100 % of control and various concentrations of tunicamycin 0 µg/ml (lane 2, control), 0.1 µg/ml (lane 3), 0.2 µg/ml (lane 4), 1 µg/ml (lane 5) and 2 µg/ml (lane 6) for 48h. Results are presented as mean±S.D. from triplicate data. (B) Bars indicate concentrations of IFN-γ (pg/ml) secreted from cultured hPBMCs (2×10^6 cells/mL, 1 mL/well) that had been pretreated with tunicamycin (0, 0.1 or 0.01 µg/ml) 16h before they were treated for 4 h with the deglycosylation enzymes O-linked glycosidase (8×10^4 units/ml) and PNGase F (10^3 units/ml). Then (□) 50 µg/ml or (■) 100 µg/ml native FIP-fve was added to RPMI 1640 that was supplemented with 5% FBS for 48 h. Conditioned media were subjected to ELISA to measure amounts of secreted IFN-γ. Data are presented as mean±S.D. from triplicate experiments. Asterisks (*) on top indicates a significant difference from the control group with a calculated $P < 0.05$.

經由初步實驗結果顯示利用醣蛋白合成抑制劑(Tunicamycin, Fig.10B)，及醣蛋白去醣酵素(PGNase 與 endo- α -N-acetyl- galactosidase, Fig.10C)，顯示兩種處理合併處理下，對於 FIP-fve 誘 hPBMC 細胞產生 IFN- γ 具有抑制的作用，這部份資料說明具有被 FIP-fve 上的醣類結合模組所辨識的多醣類結構，也在 hPBMCs 的細胞膜上存在獲得進一步的證實。綜合前面兩項研究的成果，顯示免疫調節蛋白(LZ-8)有與 TLR4 啟動免疫調節的機制有關，同時失去血液凝集能力的 FIP-fve 仍具有部分的免疫調節能力，為了探討 FIP-fve 的醣類結合模組是否是直接來藉由與 TLR4/MD-2 上的多醣類交互作用，來活化 TLR4 的訊息路徑，這部份實驗設計是利用免疫沉澱法、染色法及 pull-down 的方法，來說明 FIP-fve 與 TLR4/MD-2 上的多醣類 glycans 具有交互作用，再透過對於 TLR4/MD-2 專一性抗體中和性的實驗，以及已知構型的多醣類進行競爭，以及相關質譜儀的多醣結構分析(Royle et al., 2003)，來證明兩者之間的關係是透過 FIP-fve 上的醣類接合模組與 TLR4/MD-2 上的多醣體發生交互作用來產生。因此，本研究計畫的第二年除了要探討 FIP-fve 是透過何種方式？或與何種醣類的 ligands 作用來進入細胞內，是否也有可能藉由 FIP-fve 與過 TLR4/MD2 複合體上的多醣類有交互作用後，誘發下游訊息傳遞路徑，來進行免疫的調節作用。

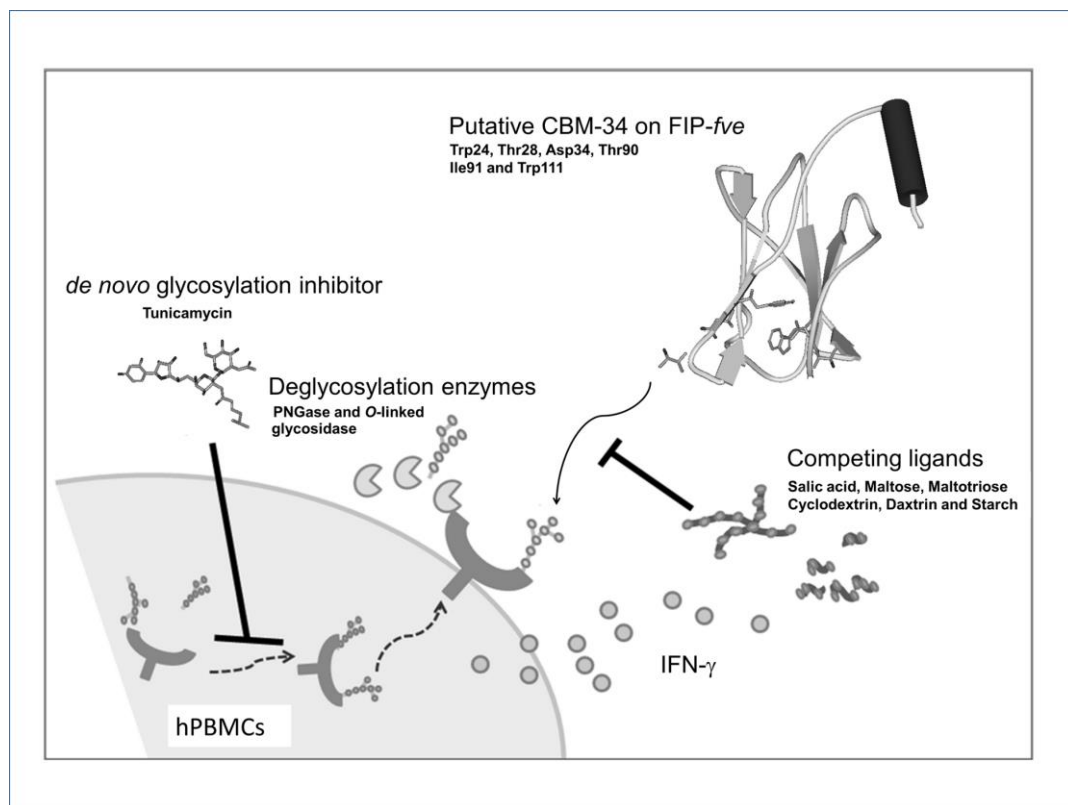


Figure 4 Proposed mechanism regulation of FIP-fve induced secretion of IFN- γ in hPBMCs. The immunomodulatory activities of FIP-fve proteins were lost when key residues W24G, T28G, D34G, T90A, I91A and W111G on putative CBM-34 were disrupted by site-directed mutagenesis, suppressed according to binding competition assay using putative ligands such as salic acid, maltose, maltotriose, cyclodextrin, dextrin and starch. Tunicamycin inhibited *de novo* glycosylation and deglycosylation enzymes, such as PNGase and *O*-linked glucosidase. Co-treatment in hPBMCs also eliminated the secretion of IFN- γ that would otherwise have been stimulated by FIP-fve.

□ 利用 *N*-glycopeptidase F 處理細胞去除細胞膜上的醣類，藉此證明 FIP-*fve* 是透過醣類或是蛋白質的交互作用，來產生免疫調節作用的 IFN- γ 。FIP-*fve* 屬於血液凝集素的一種，本身具有與廣泛的醣類結合之能力，前面實驗利用重組 rFIP-*fve* 蛋白以及相關缺失突變的資料顯示，幾乎所有缺失突變的 rFIP-*fve* 都失去了紅血球凝集的能力，並且影響誘發 IFN- γ 的產生，顯示與細胞膜上醣類結合的能力，與免疫調節作用產生 IFN- γ 有關；為了進一步確認細胞膜上醣類的影響，利用 *N*-glycopeptidase F 處理細胞，將 *N*-linked glycosylation site 的醣類去除，分析有處理及無處理酵素的免疫細胞，是否對於血液的凝集能力及 IFN- γ 細胞激素的釋出有產生影響，來證實並釐清細胞膜上的醣類，對於 FIP-*fve* 調節免疫作用的機制。

Table 1 Effects of site-directed mutagenesis of the CBM family 34 structure of rFIP-*fve* on immunomodulatory and hemagglutinating activities

Amino acid substitution in rFIP- <i>fve</i> ^a	IFN- γ production in purified recombinant protein-stimulated hPBMCs ^b		Hemagglutinating activity of purified protein ^c (μ g/ml)
	50 μ g/ml	200 μ g/ml	
Wild-type	411.58 \pm 11.78 (100)	749.78 \pm 2.46 (100)	0.25
W24G	0.00 \pm 0.58 (0)	0.00 \pm 1.70 (0)	>250
T28G	0.00 \pm 0.00 (0)	0.00 \pm 0.00 (0)	>250
T28N	249.54 \pm 2.66 (61)	676.24 \pm 3.89 (90)	0.25
D34G	0.00 \pm 2.14 (0)	0.00 \pm 3.89 (0)	>250
T90A	148.37 \pm 14.10 (36)	251.57 \pm 7.08 (34)	0.5
I91A	7.56 \pm 2.61 (1.8)	7.72 \pm 2.26 (1.0)	>250
W111G	0.00 \pm 5.66 (0)	1.56 \pm 1.30 (0.2)	>250

a. The CBM-34 structure in rFIP-*fve* comprises residues 15 to 121.

b. Immunomodulatory activity was detected as units of the IFN- γ production from stimulated-hPBMCs (50 and 200 μ g/ml) for 48 h. The IFN- γ measured by ELISA. The data shown are mean \pm SD of triplicate experiments and a percentage of the wild-type activity in parentheses.

c. Serially diluted recombinant rFIP-*fve* in 100 μ l were added to a mixture containing 100 μ l of 2% human red blood cells in PBS. The degrees of hemagglutination were recoded at 1.5 h after incubation. The original data present in Figure S1.

第 1 階段 探討 FIP-*fve* 上醣類結合模組與醣類交互作用的關鍵氨基酸

目前初步的實驗，已建立相關的重組 re-FIP-*fve*、學理性的缺失性、點突變以及醣類受質競爭的實驗方法、已完成相關的蛋白質分離與純化的方法、FIP-*fve* 紅血球凝集活性的測試，及 FIP-*fve* 誘導 hPBMCs 產生 IFN- γ 的 ELISA 測試，來檢測免疫調節蛋白 FIP-*fve* 對於免疫調節作用之影響。為了要進一步釐清 FIP-*fve* 是否會 hPBMC 細胞膜上醣類的交互作用的調控，設計以下的實驗來證明之：

□ 利用生物資訊學的方法及結構資訊，來預測 FIP-*fve* 醣類接合模組與結合醣類分子的結構。

對於金針菇免疫調節蛋白與醣類結合位 CBM34 結構的比較分析，發現在於金針菇免疫調節蛋白 (FIP-*fve*) 的功能與 α -amylase I 相似的部分，不在於具有醣類水解的活性區，而是在於具有其相類似多醣類重要辨識區段 site-N，從這個結構的分析結果，FIP-*fve* 的醣類接合模組應該與多醣類的 α -helix 結

構為主的澱粉結構。而且，關鍵性的氨基酸包含有 T28、D34、W111、W23、I91 and T90。

Table 2 Ligand specificity of FIP-*fve* determined by binding competition assay using a library of mono-, di-, oligo- and polysaccharides co-treated with FIP-*fve* induced IFN- γ secretion in hPBMCs

Ligand	Linkage	Branch	Dose	IFN- γ release (pg/ml)	Binding Competition assay ^a
Untreated	—	—	0	869±25	—
Glucose (mM)	—	—	30	921±40	—
			10	755±27	
			2	800±38	
Galactose (mM)	—	—	30	890±27	—
			10	924±51	
			2	888±9	
Mannose (mM)	—	—	30	681±24	—
			10	795±4	
			2	842±2	
Mannose-6-phosphate (mM)	—	—	30	698±16	—
			10	707±8	
			2	725±13	
Glucose-6-phosphate (mM)	—	—	30	1156±98	—
			10	916±37	
			2	725±13	
N-acetylgalactosamine (mM)	—	—	30	372±3	+
			10	703±32	
			2	1007±15	
N-acetylglucosamine (mM)	—	—	30	713±40	—
			10	759±1	
			2	866±16	
N-acetylneuraminic acid (mM)	—	—	30	< 16	+++
			10	163±4	
			2	793±4	
Maltose (mM)	α -1-4	—	30	67±1	++
			10	435±4	
			2	699±15	
Sucrose (mM)	α -1-4	—	30	502±25	—
			10	657±25	
			2	787±32	
Maltotriose (mM)	α -1-4	—	30	16±1	+++
			10	361±11	
			2	719±1	
Cyclodextrin (mM)	α -1-4	—	30	< 16	+++
			10	167±1	
			2	912±2	
Dextrin (mg/ml)	α -1-4	0-1 branch	10	< 16	+++
		/molecule	5	335±9	
		α -1-6	2	735±1	
Starch (mg/ml)	α -1-4	1 branch /	10	135±5	++
		24-30 residues	5	462±11	
		α -1-6	2	812±4	
Glycogen (mg/ml)	α -1-4	1 branch /	1	754±20	—
		10 residues	0.5	923±4	
		α -1-6	0.1	731±4	

a. The following symbols are used : -, no detectable competition; +, weak competition (the highest concentration of carbohydrates inhibit more than 50%); ++, significant competition (the second higher concentration of carbohydrates inhibit more than 50%); +++, strong competition (the highest concentration of carbohydrates inhibit more than 80%).

□ 利用以 ligand 為基礎的醣類競爭模式免疫細胞膜上證明植物凝集素 FIP-*fve* 接合的醣類接受器。

先前的報導，植物凝集素可經由 Mannose-6-phosphate 而進行 endocytosis 進入細胞的機制，雖然初步的實驗資料顯示，細胞內常見的單醣類及雙醣類(Mannose、Glucose、Sucrose 和 Galactose)、及其磷酸化醣類(Mannose-6-phosphate 和 Glucose-6-phosphate) 與 FIP-*gts*、FIP-*fve* 競爭 hPBMC 細胞膜上的醣類分子，無法競爭阻礙其進到細胞內而造成刺激 IFN- γ ，不過根據結構生物資訊學的方法來預測發現，FIP-*fve* 的醣類接合位與 α -amylase I 相似的部分，並且是以具 α -helix 摺疊的多醣類結構為主。因此，選擇免疫細胞內常見的多醣類(如: Glycogen、LPS、Starch、Chitin 和 Cellulose 等) 進行醣類競爭性實

驗，目前證明植物凝集素 FIP-*fve* 可能接合是類似澱粉類的結構。同時，並可以利用醣類水解酵素，來恢復競爭模式阻礙其進到細胞內而造成刺激 IFN- γ 產生的作用(Fig.9C)。同時，以質譜的方式來鑑定分析，FIP-*fve* 醣類結合模組所需辨識的最小多醣類的架構為何。(Royle et al., 2003)

V、文獻探討

- Abe, A., Tonozuka, T., Sakano, Y., and Kamitori, S. (2004). Complex structures of *Thermoactinomyces vulgaris* R-47 alpha-amylase 1 with malto-oligosaccharides demonstrate the role of domain N acting as a starch-binding domain. *J Mol Biol* 335, 811-822.
- Afkarian, M., Sedy, J.R., Yang, J., Jacobson, N.G., Cereb, N., Yang, S.Y., Murphy, T.L., and Murphy, K.M. (2002). T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naive CD4+ T cells. *Nat Immunol* 3, 549-557.
- Akamatsu, S., Watanabe, A., Tamesada, M., Nakamura, R., Hayashi, S., Kodama, D., Kawase, M., and Yagi, K. (2004). Hepatoprotective effect of extracts from *Lentinus edodes* mycelia on dimethylnitrosamine-induced liver injury. *Biol Pharm Bull* 27, 1957-1960.
- Ardehna, K.M., Pizzey, A.R., Devereux, S., and Khwaja, A. (2000). The PI3 kinase, p38 SAP kinase, and NF-kappaB signal transduction pathways are involved in the survival and maturation of lipopolysaccharide-stimulated human monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 96, 1039-1046.
- Blanchard, F., Raheer, S., Duplomb, L., Vusio, P., Pitard, V., Taupin, J.L., Moreau, J.F., Hoflack, B., Minvielle, S., Jacques, Y., et al. (1998). The mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor is a nanomolar affinity receptor for glycosylated human leukemia inhibitory factor. *J Biol Chem* 273, 20886-20893.
- Boraston, A.B., Bolam, D.N., Gilbert, H.J., and Davies, G.J. (2004). Carbohydrate-binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition. *Biochem J* 382, 769-781.
- Carrizo, M.E., Capaldi, S., Perduca, M., Irazoqui, F.J., Nores, G.A., and Monaco, H.L. (2005). The antineoplastic lectin of the common edible mushroom (*Agaricus bisporus*) has two binding sites, each specific for a different configuration at a single epimeric hydroxyl. *J Biol Chem* 280, 10614-10623.
- Chang, H.H., Hsieh, K.Y., Yeh, C.H., Tu, Y.P., and Sheu, F. (2010). Oral administration of an Enoki mushroom protein FVE activates innate and adaptive immunity and induces anti-tumor activity against murine hepatocellular carcinoma. *Int Immunopharmacol* 10, 239-246.
- Dorfman, D.M., and Shahsafari, A. (2002). CD69 expression correlates with expression of other markers of Th1 T cell differentiation in peripheral T cell lymphomas. *Hum Pathol* 33, 330-334.
- Guex, N., and Peitsch, M.C. (1997). SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* 18, 2714-2723.
- Guo, Y.L., Lin, Y.C., Sung, F.C., Huang, S.L., Ko, Y.C., Lai, J.S., Su, H.J., Shaw, C.K., Lin, R.S., and Dockery, D.W. (1999). Climate, traffic-related air pollutants, and asthma prevalence in middle-school children in taiwan. *Environ Health Perspect* 107, 1001-1006.
- Hauri, H., Appenzeller, C., Kuhn, F., and Nufer, O. (2000). Lectins and traffic in the secretory pathway. *FEBS Lett* 476, 32-37.
- Hewitt, C.R., Foster, S., Phillips, C., Horton, H., Jones, R.M., Brown, A.P., Hart, B.J., and Pritchard, D.I. (1998). Mite allergens: significance of enzymatic activity. *Allergy* 53, 60-63.
- Hsieh, K.Y., Hsu, C.I., Lin, J.Y., Tsai, C.C., and Lin, R.H. (2003). Oral administration of an edible-mushroom-derived protein inhibits the development of food-allergic reactions in mice. *Clin Exp*

- Allergy 33, 1595-1602.
- Hsu, H.C., Hsu, C.I., Lin, R.H., Kao, C.L., and Lin, J.Y. (1997). Fip-vvo, a new fungal immunomodulatory protein isolated from *Volvariella volvacea*. *Biochem J* 323 (Pt 2), 557-565.
- Huang, L., Sun, F., Liang, C., He, Y.X., Bao, R., Liu, L., and Zhou, C.Z. (2009). Crystal structure of LZ-8 from the medicinal fungus *Ganoderma lucidium*. *Proteins* 75, 524-527.
- Jinn, T.R., Wu, C.M., Tu, W.C., Ko, J.L., and Tzen, J.T. (2006). Functional expression of FIP-gts, a fungal immunomodulatory protein from *Ganoderma tsugae* in Sf21 insect cells. *Biosci Biotechnol Biochem* 70, 2627-2634.
- Kagan, J.C., Su, T., Horng, T., Chow, A., Akira, S., and Medzhitov, R. (2008). TRAM couples endocytosis of Toll-like receptor 4 to the induction of interferon-beta. *Nat Immunol* 9, 361-368.
- Kamitori, S., Kondo, S., Okuyama, K., Yokota, T., Shimura, Y., Tonozuka, T., and Sakano, Y. (1999). Crystal structure of *Thermoactinomyces vulgaris* R-47 alpha-amylase II (TVaII) hydrolyzing cyclodextrins and pullulan at 2.6 Å resolution. *J Mol Biol* 287, 907-921.
- Kino, K., Yamashita, A., Yamaoka, K., Watanabe, J., Tanaka, S., Ko, K., Shimizu, K., and Tsunoo, H. (1989). Isolation and characterization of a new immunomodulatory protein, ling zhi-8 (LZ-8), from *Ganoderma lucidium*. *J Biol Chem* 264, 472-478.
- Ko, J.L., Hsu, C.I., Lin, R.H., Kao, C.L., and Lin, J.Y. (1995). A new fungal immunomodulatory protein, FIP-fve isolated from the edible mushroom, *Flammulina velutipes* and its complete amino acid sequence. *Eur J Biochem* 228, 244-249.
- Ko, J.L., Lin, S.J., Hsu, C.I., Kao, C.L., and Lin, J.Y. (1997). Molecular cloning and expression of a fungal immunomodulatory protein, FIP-fve, from *Flammulina velutipes*. *J Formos Med Assoc* 96, 517-524.
- Kuo, C.J., Chen, V.C., Lee, W.C., Chen, W.J., Ferri, C.P., Stewart, R., Lai, T.J., Chen, C.C., Wang, T.N., and Ko, Y.C. (2010). Asthma and suicide mortality in young people: a 12-year follow-up study. *Am J Psychiatry* 167, 1092-1099.
- Labuda, T., Sundstedt, A., and Dohlsten, M. (2000). Selective induction of p38 mitogen-activated protein kinase activity following A6H co-stimulation in primary human CD4(+) T cells. *Int Immunol* 12, 253-261.
- Lai, C.L., Shyur, S.D., Wu, C.Y., Chang, C.L., and Chu, S.H. (2002). Specific IgE to 5 different major house dust mites among asthmatic children. *Acta Paediatr Taiwan* 43, 265-270.
- Larche, M., Robinson, D.S., and Kay, A.B. (2003). The role of T lymphocytes in the pathogenesis of asthma. *J Allergy Clin Immunol* 111, 450-463; quiz 464.
- Lee, C.S., Tang, R.B., and Chung, R.L. (2000). The evaluation of allergens and allergic diseases in children. *J Microbiol Immunol Infect* 33, 227-232.
- Liao, C.H., Hsiao, Y.M., Lin, C.H., Yeh, C.S., Wang, J.C., Ni, C.H., Hsu, C.P., and Ko, J.L. (2008). Induction of premature senescence in human lung cancer by fungal immunomodulatory protein from *Ganoderma tsugae*. *Food Chem Toxicol* 46, 1851-1859.
- Liao, C.H., Hsiao, Y.M., Sheu, G.T., Chang, J.T., Wang, P.H., Wu, M.F., Shieh, G.J., Hsu, C.P., and Ko, J.L. (2007). Nuclear translocation of telomerase reverse transcriptase and calcium signaling in repression of telomerase activity in human lung cancer cells by fungal immunomodulatory protein from *Ganoderma tsugae*. *Biochem Pharmacol* 74, 1541-1554.
- Liao, F.T., Lee, Y.J., Ko, J.L., Tsai, C.C., Tseng, C.J., and Sheu, G.T. (2009). Hepatitis delta virus epigenetically enhances clusterin expression via histone acetylation in human hepatocellular carcinoma

- cells. *J Gen Virol* 90, 1124-1134.
- Lieu, C.W., Lee, S.S., and Wang, S.Y. (1992). The effect of *Ganoderma lucidum* on induction of differentiation in leukemic U937 cells. *Anticancer Res* 12, 1211-1215.
- Lighvani, A.A., Frucht, D.M., Jankovic, D., Yamane, H., Aliberti, J., Hissong, B.D., Nguyen, B.V., Gadina, M., Sher, A., Paul, W.E., *et al.* (2001). T-bet is rapidly induced by interferon-gamma in lymphoid and myeloid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 15137-15142.
- Lin, J.Y., Lin, Y.J., Chen, C.C., Wu, H.L., Shi, G.Y., and Jeng, T.W. (1974). Cardiotoxic protein from edible mushrooms. *Nature* 252, 235-237.
- Lin, W.H., Hung, C.H., Hsu, C.I., and Lin, J.Y. (1997). Dimerization of the N-terminal amphipathic alpha-helix domain of the fungal immunomodulatory protein from *Ganoderma tsugae* (Fip-gts) defined by a yeast two-hybrid system and site-directed mutagenesis. *J Biol Chem* 272, 20044-20048.
- Lin, Y.L., Liang, Y.C., Tseng, Y.S., Huang, H.Y., Chou, S.Y., Hseu, R.S., Huang, C.T., and Chiang, B.L. (2009). An immunomodulatory protein, Ling Zhi-8, induced activation and maturation of human monocyte-derived dendritic cells by the NF-kappaB and MAPK pathways. *J Leukoc Biol* 86, 877-889.
- Macia, E., Ehrlich, M., Massol, R., Boucrot, E., Brunner, C., and Kirchhausen, T. (2006). Dynasore, a cell-permeable inhibitor of dynamin. *Dev Cell* 10, 839-850.
- Mau, J.L., Lin, H.C., and Chen, C.C. (2002). Antioxidant properties of several medicinal mushrooms. *J Agric Food Chem* 50, 6072-6077.
- Mellman, I., and Steinman, R.M. (2001). Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell* 106, 255-258.
- Nishitani, C., Takahashi, M., Mitsuzawa, H., Shimizu, T., Ariki, S., Matsushima, N., and Kuroki, Y. (2009). Mutational analysis of Cys(88) of Toll-like receptor 4 highlights the critical role of MD-2 in cell surface receptor expression. *Int Immunol* 21, 925-934.
- Ou, C.C., Hsiao, Y.M., Wu, W.J., Tasy, G.J., Ko, J.L., and Lin, M.Y. (2009). FIP-fve stimulates interferon-gamma production via modulation of calcium release and PKC-alpha activation. *J Agric Food Chem* 57, 11008-11013.
- Paaventhana, P., Joseph, J.S., Seow, S.V., Vaday, S., Robinson, H., Chua, K.Y., and Kolatkar, P.R. (2003). A 1.7A structure of Fve, a member of the new fungal immunomodulatory protein family. *J Mol Biol* 332, 461-470.
- Royle, L., Roos, A., Harvey, D.J., Wormald, M.R., van Gijlswijk-Janssen, D., Redwan el, R.M., Wilson, I.A., Daha, M.R., Dwek, R.A., and Rudd, P.M. (2003). Secretory IgA N- and O-glycans provide a link between the innate and adaptive immune systems. *J Biol Chem* 278, 20140-20153.
- Stirpe, F. (2004). Ribosome-inactivating proteins. *Toxicon* 44, 371-383.
- Sun, H.L., and Lue, K.H. (2000). Household distribution of house dust mite in central Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect* 33, 233-236.
- Tanaka, S., Ko, K., Kino, K., Tsuchiya, K., Yamashita, A., Murasugi, A., Sakuma, S., and Tsunoo, H. (1989). Complete amino acid sequence of an immunomodulatory protein, ling zhi-8 (LZ-8). An immunomodulator from a fungus, *Ganoderma lucidum*, having similarity to immunoglobulin variable regions. *J Biol Chem* 264, 16372-16377.
- Wang, P.H., Hsu, C.I., Tang, S.C., Huang, Y.L., Lin, J.Y., and Ko, J.L. (2004). Fungal immunomodulatory protein from *Flammulina velutipes* induces interferon-gamma production through p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *J Agric Food Chem* 52, 2721-2725.

- Wang, P.H., Yang, S.F., Chen, G.D., Han, C.P., Chen, S.C., Lin, L.Y., and Ko, J.L. (2007). Human nonmetastatic clone 23 type 1 gene suppresses migration of cervical cancer cells and enhances the migration inhibition of fungal immunomodulatory protein from *Ganoderma tsugae*. *Reprod Sci* *14*, 475-485.
- Wang, T.N., Chu, Y.T., Chen, W.Y., Feng, W.W., Shih, N.H., Hsiang, C.H., and Ko, Y.C. (2006). Association of interferon-gamma and interferon regulatory factor 1 polymorphisms with asthma in a family-based association study in Taiwan. *Clin Exp Allergy* *36*, 1147-1152.
- Wang, T.N., Ko, Y.C., Chao, Y.Y., Huang, C.C., and Lin, R.S. (1999). Association between indoor and outdoor air pollution and adolescent asthma from 1995 to 1996 in Taiwan. *Environ Res* *81*, 239-247.
- Wasser, S.P. (2002). Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Appl Microbiol Biotechnol* *60*, 258-274.
- Wasser, S.P., and Weis, A.L. (1999). Therapeutic effects of substances occurring in higher Basidiomycetes mushrooms: a modern perspective. *Crit Rev Immunol* *19*, 65-96.
- Wu, C.M., Wu, T.Y., Kao, S.S., Ko, J.L., and Jinn, T.R. (2008). Expression and purification of a recombinant Fip-fve protein from *Flammulina velutipes* in baculovirus-infected insect cells. *J Appl Microbiol* *104*, 1354-1362.
- Wu, C.T., Lin, T.Y., Hsu, H.Y., Sheu, F., Ho, C.M., and Chen, E.I. (2011). Ling Zhi-8 mediates p53-dependent growth arrest of lung cancer cells proliferation via the ribosomal protein S7-MDM2-p53 pathway. *Carcinogenesis* *32*, 1890-1896.
- Yeh, C.H., Chen, H.C., Yang, J.J., Chuang, W.I., and Sheu, F. (2010). Polysaccharides PS-G and protein LZ-8 from Reishi (*Ganoderma lucidum*) exhibit diverse functions in regulating murine macrophages and T lymphocytes. *J Agric Food Chem* *58*, 8535-8544.
- Yoshimura, S., Bondeson, J., Foxwell, B.M., Brennan, F.M., and Feldmann, M. (2001). Effective antigen presentation by dendritic cells is NF-kappaB dependent: coordinate regulation of MHC, co-stimulatory molecules and cytokines. *Int Immunol* *13*, 675-683.
- Yssel, H., Johnson, K.E., Schneider, P.V., Wideman, J., Terr, A., Kastelein, R., and De Vries, J.E. (1992). T cell activation-inducing epitopes of the house dust mite allergen Der p I. Proliferation and lymphokine production patterns by Der p I-specific CD4+ T cell clones. *J Immunol* *148*, 738-745.

國科會補助專題研究計畫成果報告自評表

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：

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 100 字為限)

1. 可告知民眾菇類免疫調節蛋白的好處，它具有抗過敏、免疫調節的功能、及增強免疫功能。

對於醫藥從業人員之教育的宣導，為說明菇類免疫調節功能蛋白作用的生化機制，增加菇類對於調節免疫作用方面的科學證據。對於參與的研究人員可以學習到如何運用生物資訊學的工具與方法，其他如：細胞培養、RNA 萃取、Genomic DNA 抽取、Western blot、Real-time PCR 和 MSP 等實驗技術之外，並讓相關研究人員與如何透過飲食療法來解決醫學生物的問題。同時透過醣類接合模組的建立，可以作為修改增強合有藥效活性(其具有調節免疫系統的部分)，降低不好的副作用(造成血液凝集的部分)

國科會補助專題研究計畫項下出席國際學術會議心得報告

日期：102年10月28日

計畫編號	NSC 101-2320-B-040-011-		
計畫名稱	探討真菌免疫調節蛋白的醣類結合模組在誘發人類周邊單核球細胞產生干擾素 γ 作為減緩氣喘之健康食品的應用		
出國人員姓名	劉玉凡	服務機構及職稱	中山醫學大學生物醫學科學學系 副教授
會議時間	102年3月17日 至 102年3月19日	會議地點	新加坡
會議名稱	(中文)2013 亞洲植物與動物基因體年會 (英文) 2013 PAG Asia		
發表論文題目	(中文) 金針菇免疫蛋白作為健康食品在誘發免疫球細胞於塵璠上的應用 (英文) Mechanism of IFN-γ induction using Fungal Immunomodulatory Protein regulated T helper cell differentiation as healthy food application to alleviate House Dust Mite induced Asthma		

一、參加會議經過

經過相關會議報名的前置作業及學校相關請假與調課的過程，終於3月16日套上遠赴新加坡的旅程，在開會前一天的晚上時間到達樟宜機場，因為在事前有做一些功課，所以直接搭乘捷運系統及步行到達開會地點 Grand Copthorne Waterfront 旅館，因為是一個前往也沒有安排特別的拜會活動。第二天會議開始，首先完成會議報到的手續及領取會議的資料，會議約有數百人參加，多以東亞地區的學者與相關的公司研究單外居多，正好可以利用這個時機，來觀察亞洲國家在 Genome 學領域發展的情形。與會報告的人員以中國大陸、日本、韓國與本地新加坡的科學家居多，印象特別深刻的是中國大陸是以“華大基因”(BGI)一家公司的研究成果，就包下一整個子會議的內容，從他們所發表的議題內容 - “Million Plant & Animal Genomes”的企圖心就看得出來，幾乎是國家層級的資源與力量來全

力的發展這個領域，也是目前國內實驗室多以進行個體戶的單打獨鬥的研究領域發展所難與項望其背。在與會的第一天、第二天的會議中，也利用一些時間去參觀以及發表 Posters，近距離的了解目前這個領域各個研究室最新的發展，在會議中也遇到到新加坡參展的國內廠商，因為地緣以及領域相同的關係，和他們聊聊最新國內的發展及商業領域契機，我們都同意在技術與規模上，與國外大型公司相較起來，真有點兒”大巫見小巫”之感，如何發展小而美且具有本土特色的研究領域，是共同認可的發展方向；最後一天的下午有一場與生技廠商的會談，因為計畫執行的需要，與會取得一些分析的軟體及硬體內容的資料，並把我們在研究的需求與廠商交換一下了意見，他們很熱心的提供我們將來可以發展的寶貴建議與內容，在得到這些寶貴的資料與資訊後，下午就直接坐捷運趕到樟宜機場，結束了這三天三夜的會議旅程，平安的回到桃園中正機場。

二、與會心得

可能是該項會議是在亞洲地區來舉辦的關係，因此，所討論的議題內容與亞洲國家的民情會比較接近，例如：稻米或是亞洲常見的畜產、水產相關的議題，說真的不論是多高深的研究工作，對於開發中的國家來說不如歐美國家，”民以食為天”是這個地區的領袖們，最重要並且迫切需要解決的問題還是在於人民吃的問題，參與這次會議之後，個人強烈建議利用”基因體的技術”來加速育種的過程與生態調查的推廣，除了可以大幅提供精確性與預測性之外，也可以對於本土的資源做更有效的利用與開發，例如：在第二天的會議中聽到關於 Swine genome 的議題，包括先進國家日本與韓國也開始已經利用 Protein-protein interaction networks(Genome-wide) 的方式，作為對於育種豬隻的肌肉組織，正向基因的篩選標準，同時也可利用 Pig QTL 的方式作為育種的依據，同時也有討論利用豬隻組織相容性基因(MHCs)的多樣性分析，來增加畜養動物的疾病抗性，當然在目前人畜共通傳染病盛行的年代，顯示這項生物科技在基因體分析的快速發展，更凸顯得這項技術的重要性。另一方面，利用新發展的次世代定序技術，除了大量降低基因體分析的成本外，也加快這方面研究工作的進展，不過在會議的過程中，也感覺到每個實驗對於所發展的成果，因為國家因素或是商業利益的考量，多半只要涉及到核心的資料內容時，就會採取合作保留的態度；因此，如何快速的建立本土的研究動能，加速趕上國際的水準外，沒有辦法透過管道的迅速達成的方法，相對的，建立本土的基因體資料庫，也是保護國內生技產業發展的一項重要的策略。

三、考察參觀活動(無是項活動者略)

無。

四、建議

五、攜回資料名稱及內容

Plant & Animal Genome Asia 2013 會議手冊，參展廠商的產品介紹等。

六、其他

國科會補助專題研究計畫項下出席國際學術會議心得報告

日期：102年10月28日

計畫編號	NSC 101-2320-B-040-011-		
計畫名稱	探討真菌免疫調節蛋白的醣類結合模組在誘發人類周邊單核球細胞產生干擾素 γ 作為減緩氣喘之健康食品的應用		
出國人員姓名	劉玉凡	服務機構及職稱	中山醫學大學生物醫學科學學系 副教授
會議時間	102年3月17日 至 102年3月19日	會議地點	新加坡
會議名稱	(中文)2013 亞洲植物與動物基因體年會 (英文) 2013 PAG Asia		
發表論文題目	(中文) 金針菇免疫蛋白作為健康食品在誘發免疫球細胞於塵璠上的應用 (英文) Mechanism of IFN-γ induction using Fungal Immunomodulatory Protein regulated T helper cell differentiation as healthy food application to alleviate House Dust Mite induced Asthma		

一、參加會議經過

經過相關會議報名的前置作業及學校相關請假與調課的過程，終於3月16日套上遠赴新加坡的旅程，在開會前一天的晚上時間到達樟宜機場，因為在事前有做一些功課，所以直接搭乘捷運系統及步行到達開會地點 Grand Copthorne Waterfront 旅館，因為是一個前往也沒有安排特別的拜會活動。第二天會議開始，首先完成會議報到的手續及領取會議的資料，會議約有數百人參加，多以東亞地區的學者與相

關的公司研究單外居多，正好可以利用這個時機，來觀察亞洲國家在 Genome 學領域發展的情形。與會報告的人員以中國大陸、日本、韓國與本地新加坡的科學家居多，印象特別深刻的是中國大陸是以“華大基因”(BGI)一家公司的研究成果，就包下一整個子會議的內容，從他們所發表的議題內容 - “Million Plant & Animal Genomes”的企圖心就看得出來，幾乎是國家層級的資源與力量來全力的發展這個領域，也是目前國內實驗室多以進行個體戶的單打獨鬥的研究領域發展所難與項望其背。在與會的第一天、第二天的會議中，也利用一些時間去參觀以及發表 Posters，近距離的了解目前這個領域各個研究室最新的發展，在會議中也遇到到新加坡參展的國內廠商，因為地緣以及領域相同的關係，和他們聊聊最新國內的發展及商業領域契機，我們都同意在技術與規模上，與國外大型公司相較起來，真有點兒“大巫見小巫”之感，如何發展小而美且具有本土特色的研究領域，是共同認可的發展方向；最後一天的下午有一場與生技廠商的會談，因為計畫執行的需要，與會取得一些分析的軟體及硬體內容的資料，並把我們在研究的需求與廠商交換一下了意見，他們很熱心的提供我們將來可以發展的寶貴建議與內容，在得到這些寶貴的資料與資訊後，下午就直接坐捷運趕到樟宜機場，結束了這三天三夜的會議旅程，平安的回到桃園中正機場。

二、與會心得

可能是該項會議是在亞洲地區來舉辦的關係，因此，所討論的議題內容與亞洲國家的民情會比較接近，例如：稻米或是亞洲常見的畜產、水產相關的議題，說真的不論是多高深的研究工作，對於開發中的國家來說不如歐美國家，“民以食為天”是這個地區的領袖們，最重要並且迫切需要解決的問題還是在於人民吃的問題，參與這

次會議之後，個人強烈建議利用“基因體的技術”來加速育種的過程與生態調查的推廣，除了可以大幅提供精確性與預測性之外，也可以對於本土的資源做更有效的利用與開發，例如：在第二天的會議中聽到關於 Swine genome 的議題，包括先進國家日本與韓國也開始已經利用 Protein-protein interaction networks(Genome-wide)的方式，作為對於育種豬隻的肌肉組織，正向基因的篩選標準，同時也可利用 Pig QTL 的方式作為育種的依據，同時也有討論利用豬隻組織相容性基因(MHCs)的多樣性分析，來增加畜養動物的疾病抗性，當然在目前人畜共通傳染病盛行的年代，顯示這項生物科技在基因體分析的快速發展，更凸顯得這項技術的重要性。另一方面，利用新發展的次世代定序技術，除了大量降低基因體分析的成本外，也加快這方面研究工作的進展，不過在會議的過程中，也感覺到每個實驗對於所發展的成果，因為國家因素或是商業利益的考量，多半只要涉及到核心的資料內容時，就會採取合作保留的態度；因此，如何快速的建立本土的研究動能，加速趕上國際的水準外，沒有辦法透過管道的迅速達成的方法，相對的，建立本土的基因體資料庫，也是保護國內生技產業發展的一項重要的策略。

三、考察參觀活動(無是項活動者略)

無。

四、建議

五、攜回資料名稱及內容

Plant & Animal Genome Asia 2013 會議手冊，參展廠商的產品介紹等。

六、其他

國科會補助計畫衍生研發成果推廣資料表

日期:2013/10/24

國科會補助計畫	計畫名稱: 探討真菌免疫調節蛋白的醣類結合模組在誘發人類周邊單核球細胞產生干擾素 γ 作為減緩氣喘之健康食品的應用
	計畫主持人: 劉玉凡
	計畫編號: 101-2320-B-040-011- 學門領域: 保健營養
無研發成果推廣資料	

101 年度專題研究計畫研究成果彙整表

計畫主持人：劉玉凡		計畫編號：101-2320-B-040-011-					
計畫名稱：探討真菌免疫調節蛋白的醣類結合模組在誘發人類周邊單核球細胞產生干擾素 γ 作為減緩氣喘之健康食品的應用							
成果項目		量化			單位	備註（質化說明：如數個計畫共同成果、成果列為該期刊之封面故事...等）	
		實際已達成數（被接受或已發表）	預期總達成數（含實際已達成數）	本計畫實際貢獻百分比			
國內	論文著作	期刊論文	1	1	100%	篇	J. Agric. Food Chem. 2012, 60, 4914-922
		研究報告/技術報告	0	0	100%		
		研討會論文	1	1	100%		PAG Asia 2013, Singapore
		專書	0	0	100%		
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力（本國籍）	碩士生	0	0	100%	人次	
		博士生	0	0	100%		
博士後研究員		0	0	100%			
專任助理		2	1	100%			
國外	論文著作	期刊論文	0	0	100%	篇	
		研究報告/技術報告	0	0	100%		
		研討會論文	0	0	100%		
		專書	0	0	100%	章/本	
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力（外國籍）	碩士生	0	0	100%	人次	
		博士生	0	0	100%		
博士後研究員		0	0	100%			
專任助理		0	0	100%			

<p>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。)</p>	<p>無</p>
--	----------

	成果項目	量化	名稱或內容性質簡述
科 教 處 計 畫 加 填 項 目	測驗工具(含質性與量性)	0	
	課程/模組	0	
	電腦及網路系統或工具	0	
	教材	0	
	舉辦之活動/競賽	0	
	研討會/工作坊	0	
	電子報、網站	0	
	計畫成果推廣之參與(閱聽)人數	0	

國科會補助專題研究計畫成果報告自評表

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：

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 100 字為限）

J. Agric. Food Chem. 2012, 60, 4914-922

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）

1. 評估研究成果之學術或應用價值

發展 FIP-fve 成為減緩塵蟎所誘發之氣喘藥物與作為健康食品的潛力

2. 學術成就

探討 FIP-fve 與交互作用受體上的多醣類作用機制

3. 社會影響

其中 90% 以上的小兒氣喘體質之過敏原中又以塵蟎為最多，因此開發食物療法來減緩小兒過敏性氣喘的問題，為當前衛生保健的議題上所急需之一

4. 應用價值

利用普遍被食用之蕈類-金針菇所萃取出蛋白進行治療，或是透過飲食療法的方式，以期達到最小副作用之療效，同時也可減緩過敏性疾病的發生。

5. 技術創新

可以作為修改與增強和有藥效活性的學理基礎，（其具有調節免疫系統的部分），降低不好的副作用（造成血液凝集的部分）