

出國報告(出國類別：進修)

真菌異源表達平台於天然產物之 開發與發展應用

服務機關：國防醫學院

姓名職稱：林書儀、少校教師

派赴國家/地區：美國洛杉磯

出國期間：108年8月12日至112年12月29日

報告日期：113年1月5日

摘要

天然產物(Natural Products, NPs)在藥物開發的過程中佔有一定的重要角色，自 1929 年科學家弗萊明從青黴菌提取出青黴素後，藥學界迎來了近七十年的黃金時代(The Golden Age)，而青黴素更是在第二次世界大戰(World War II)中拯救了上百萬軍士官的生命，於此同時許多臨床上使用的抗生素及抗癌藥物等皆在此時期問世。然而，因各種傳統技術上的限制，天然物的開發在二十世紀末開始面臨重複發現已知的化合物或難以量產等困境，所幸，在二十一世紀初，由於各種基因體定序技術以及生物資訊學的進步，讓天然物的研究得以從基因的角度進行探討。Dr. Clay Wang 實驗室是利用基因角度探討真菌天然物的生物合成途徑的先驅，故此次赴美之研究主題與真菌天然物相關，經過近四年四個月之努力，最終順利通過博士論文口試，並提前取得學位返國。

目次

摘要.....	2
本文.....	4
一、目的.....	4
二、過程.....	5
三、心得及建議.....	10
四、致謝.....	11

本文

一、目的

此次出國進修目的為培育藥學系基礎研究的師資，並期能為系上的教學研究引進新的課程方向，因此我將出國目的分成三大面向，分別為「充實藥學研究本職學能」、「了解美國藥學制度」及「增進國際交流」，為達成此目的，我選擇前往美國南加州大學藥學院藥物科學研究所進修，美國南加州大學藥學院是美國西岸具有悠久歷史的私立研究型大學，更是最早推動 Pharm. D. (Doctor of Pharmacy) 臨床藥學博士學制的學校之一，所以在進修期間，除了最重要的在博士研究方面我可以學習到前沿的藥學研究技術，另一方面也可以觀察學校的藥學課程，更期待未來有機會可以建立國防醫學院與南加州大學藥學院兩校之間合作橋樑，相信能幫助藥學系未來的發展。

二、過程

博士第一年正式開學前學院安排一周新生訓練課程，介紹系上環境和學程相關規定讓學生盡快進入狀況，由於就讀之學程須進行 rotation，可藉此機會了解系上教授們的研究領域，一開始選擇於中研院陳景虹院士(Prof. Jean Chen Shih)實驗室學習與研究。正式開學後，由於尚在全英文學習環境轉換的適應期，故第一學期以修課為主，並利用課餘時間參加實驗室 meeting、院內及院外演講等，另外也學習一般實驗室安全規則以及單胺氧化酶 A (MAO A) 研究相關實驗技術，像是 MAO A 活性測定、Pten knockout mice breeding 等。在經過一連串的報告和考試後，美國進修的第一學期於期末考後正式結束，第一學期雖然修習課目較多(總共 12 學分)，但課程學習上皆已適應且全科合格，其中藥理學特論成績為 A- (90 分以上)、藥理學成績為 A- (90 分以上)、研究方法與科學性寫作成績為 A (95 分以上)、學術寫作技巧成績為 CR (通過，90 分以上)。與班上同學相處融洽，且因課程中常有分組報告，因此有許多機會可和同學交流討論，也藉此機會多多訓練自己的英文能力。實驗方面目前尚未擬定研究主題，不過與教授討論後主要方向為研究單胺氧化酶與 neuroblastoma 的關係以及可能的治療策略，預計於一年級下學期正式開始進行相關之實驗。

博士一年級下學期前半部在實驗與修課中度過，因已有第一學期的經驗，修課部分已可適應美國上課的節奏，對於課程內容也多可掌握，但實驗上還在摸索階段，有大方向但還沒有指標性的結果。然而，在期中考週之後，歐美地區新冠肺炎(COVID-19) 突然大爆發，所以學校在 2020/3/11 就開始測試遠距線上授課，並且宣布於 2020/3/23 起，除了必要性的實驗之外(例如：動物實驗)，所有實驗室皆須關閉，且學校開始進行管制並限制人員進出，起初公告管制至 3 月底，但美國新冠肺炎疫情非常嚴重，所以政府防疫政策頻繁修改，更糟的是，

此時期因黑人「弗洛伊德之死」事件，造成美國各地因種族歧視議題而發起大大小小的抗議與暴動事件，當中發生許多趁火打劫的情形，甚至因抗爭活動太激烈，政府下令實施宵禁 (curfew)，完全禁止民眾於晚上出門。這些案件嚴重惡化疫情控制的狀況，因此為了避免感染及確保人身安全，我都選擇待在家中不出門，民生物資方面依然透過網路 APP 訂購方式購買，防疫物資方面每月都會接收到國防部分配的口罩(12片/月)。

因美國新冠肺炎疫情嚴峻，學校於 2020/3/23 起關閉，直到 7 月初才逐步有限制地開放，這段期間因指導老師陳景虹教授年紀較大且長期服用免疫抑制劑，出門有很高的感染風險，因此自從 3 月初老師就沒有再進過實驗室，且似乎隨時有退休的可能，實驗室也處於比較低迷的狀態，反覆考慮良久之後，我決定換實驗室，最終換到 Dr. Clay Wang 的實驗室，新實驗室主要進行真菌天然物相關的藥物開發研究，包含以分子生物及生物資訊等技術來研究天然物的生物合成途徑，以及新穎天然物的分離與鑑定等。

博士第二年開始後，為避免群聚效應造成感染風險提高，學校僅開放 30%人員同時處在整棟建築中，所以我們去實驗室必須以輪班的方式進行，雖然不太便利，但新實驗室有許多前輩可以指導我，這學期我開始學習真菌培養、基因調控及化合物鑑定等技術。修課方面這學期仍採線上教學方式進行，但很多課都被取消所以能選的課很少，因此僅選修一門「生物製劑與特殊劑型」，課業方面算是比較輕鬆的，最終期末成績為 A (95 分以上)。這學期開始花比較多時間在研究上，雖然學校屬於有限制的開放且我們去 lab 需要輪班，但比起開放前已經好很多了，幾乎每天都可以去做實驗，期末時已經學會了真菌培養、次級代謝物萃取與基本鑑定，以及一些基因編輯(editing)與轉化(transformation)等技術，不過還沒有到非常熟悉，尚需更多練習來累積相關經驗。

博士第二年下學期選修「藥物科學特論」以及「毒理學」二門線上課程，修課方面已習慣線上的授課方式，實驗部分已學會實驗室常用的技術，但 project 進度仍在嘗試與摸索階段，嘗試利用提供前驅物餵養黴菌的方式，來修飾複雜結構的活性天然物，使其具有特殊官能基來做後續的抗體接合，但可能黴菌中的生物合成酵素專一性太高，一直無法產出我們預期的化合物。另一方面，美國自 2020 年底開始施打新冠疫苗，雖然在 2021 年 1 月時因聖誕假期剛結束而有許多新增案例，但自 2 月起隨著疫苗施打率的提高，疫情狀況也開始逐漸減緩，政策也逐漸開放，4 月起有許多商店、場館以及百貨公司可以陸續開始營業，學校也決定自 4 月起可完全開放實驗室研究工作。我個人部分於 2021/3/13 完成莫德納 (Moderna) 新冠疫苗第一劑施打，並於 28 天後 2021/4/10 施打第二劑，施打後除注射部位疼痛外，並無明顯不適感或嚴重副作用。這學期選修的「藥物科學特論」以及「毒理學」二門課程最終期末成績皆為 A (95 分以上)，因這學期修完課後已滿足參加資格考的必要學分，所以需要開始撰寫 proposal 並準備筆試以及口試資格考。

博士第三年因為已經將需要的 lecture 學分修習完畢，所以可以專注於研究部分，另外依照學校規定，學生需要於本學期完成資格考試並取得博士候選人資格才能繼續攻讀學位，所以這學期在一邊做研究一邊準備博士資格考中度過，並於 2021/12/8 進行資格考口試，報告整體還算滿平順的，且口試過程中委員們皆熱烈的提問與討論，大約經過 2 個小時後完成口試的部分，結束後委員們自行進行討論並投票，完成後要我回到現場宣布結果，在一陣緊張的氛圍下，最終由我的指導教授宣布我通過博士資格考。

博士第三年下學期因為已通過博士資格考，並取得博士候選人資格，所以研究方向更加明確，另外也嘗試開啟新的合成生物學 (synthetic biology) 相關的項目，在天然物領域中，常

遇到一個問題就是篩選到的活性化合物產率 (yield) 過低，因此大大提高了天然物新藥開發的成本，所以我想利用異源表達的方式，將一些高價值天然物的生物合成基因，表達在我們可以調控的模式真菌，如此一來，將有機會以基因調控的技術去提高這些天然物的產率，希望可以減低整體新藥開發的成本。

博士第四年上學期開始我將手上有的項目進行投稿規劃及文章撰寫，主要可分為三個不同的文章，第一篇文章是利用異源表達來提高高價值天然物產率，我不僅成功利用基因編輯方式完成菌種優化，該項目更是結合了實驗室最新嘗試的研究方向，也就是利用塑膠降解物來提供黴菌的可用的碳源，進而生產出我們預期的化合物，希望可將造成嚴重環境污染的塑膠廢物升級再造為高價值天然物。第二篇文章是以異源表達方式活化在 *Aspergillus fumigatus* 中一個有趣且未知的基因簇，此項目分離出十二種不同化合物，且在鑑定化合物結構後推導出可能的生物合成路徑(biosynthetic pathway)。第三篇文章是表達一個在 *Aspergillus homomorphus* 中可能會製造 prenylated indole alkaloids 的基因簇，此項目成功活化該基因簇，且分離出八種不同化合物。

不幸的是，在這段期間得知母親罹患肺腺癌且已轉移至腦部，雖有對應的標靶藥物可供治療，但我仍非常擔心，因此於 2023 年 1 月返台探視家人，這也是在疫情開始三年後第一次返台，很高興有這次返台機會可以好好與家人團聚。在標靶藥物的治療下，母親每次回診皆發現癌指數有穩定下降，可見標靶藥物應該是有效果，雖然服用標靶藥物仍會導致一些如甲溝炎、腹瀉、皮疹等副作用，且對於腦部轉移的腫瘤並無顯著效果，但整體的狀況還算穩定並持續積極治療，在家人們的支持與鼓勵下，我重新赴美繼續我的博士進修。

博士第四年下學期，手上三個主要項目陸續開始進行投稿，第一個是利用真菌異源表達

系統進行生物合成升級再造塑料廢料為高價值天然產物，該文章於 2023 年 1 月底獲刊於 *Journal of the American Chemical Society*，題目為“Polystyrene upcycling into fungal natural products and a biocontrol agent”。第二個則是以異源表達方式活化在人類致病菌 *Aspergillus fumigatus* 中一個有趣且未知的基因簇，該項目文章於 2023 年 6 月底獲刊於 *Chemical Science*，題目為“A heterologous expression platform in *Aspergillus nidulans* for the elucidation of cryptic secondary metabolism biosynthetic gene clusters: discovery of the *Aspergillus fumigatus* sartorypyrone biosynthetic pathway”。第三個項目是表達一個可能會產生 prenylated indole 生物鹼的基因簇，此項目分離出八種不同化合物並完成結構鑑定，我也開始著手該項目的 manuscript 撰寫。這段期間因為疫情與家人生病的關係影響了我的研究進度，因此我向國防部申請延長修業，接著博士班最重要的 dissertation defense 於 2023/11/9 進行，我的論文最終分成五個章節，其中包含二篇已發表，以及一篇準備投稿的文章，口試過程中聽眾以及口委們皆提出許多有幫助的評論與建議，最後在非常 emotional 的致謝中順利完成，回顧這四年多以來的求學過程，有太多酸苦只有自己知道，除了剛來不到一年就遇到持續近三年的疫情大爆發，以及更換實驗室並重新開始全新項目之外，更經歷了幾位家人們的生病與離世，很多時候都有自我懷疑甚至想放棄的念頭，但還好有太太的陪伴與家人朋友們的鼓勵，讓我最後終於能順利完成，並於年底學期結束後提前取得學位返國。

三、心得及建議

1. 作圖是文章發表及製作簡報非常重要的部分，常言道一張好圖勝過千言萬語，有好的繪圖軟體可以大大提高作圖的效率，我在美國常常使用 **BioRender** 專業學術繪圖軟體來畫各種圖，此軟體提供許多簡明且好用的模板，很適合畫示意圖。非常建議本校也可以購買相關軟體，相信對各研究人員皆能有所助益。
2. 在進修期間，我發現有許多來自不同國家的大學生會參加南加州大學藥學院的暑假課程，其中也包含了台灣各藥學系的學生，該暑期課程不僅包含藥物開發、藥物治療及藥事法規等相關主題，更有許多分組 **workshop** 討論報告的上課模式，讓不同國家間的學生得以進行交流，更重要的是此課程屬學院舉辦的正式課程，因此會提供學生簽證並於結業時授予證書，可惜的是國防藥學系學生之前都沒有這個機會參與該課程。
為了爭取參與課程機會，我向南加大藥學院副院長 **Terrence Graham** 詢問簽署合作備忘錄（**Memorandum of understanding, MOU**）的可能，結果收到非常正面的答覆，因此希望本校國際事務組能夠協助辦理相關事宜，讓本校有機會與南加州大學藥學院能有更進一步交流的機會。
3. 學生在美國的指導教授 **Dr. Clay Wang**，目前任職於美國南加州大學藥學院藥理暨藥物科學研究所教授兼系主任，其研究領域橫跨化學生物學、分子生物學以及天然物化學，並聚焦於以基因體探勘及基因編輯方式探討真菌天然物的生物合成途徑，此外，王教授與美國太空總署(NASA)以及環境保護相關單位亦有多個創新的合作項目，因此目前已累積超過百篇著作發表於各大科學期刊。
預計於今年度九月下旬邀請王教授蒞院講學，相信不僅可進行學術交流與知識分享，更

能促進本院藥學研究的創新並啟發更多學術新思維，除此之外，本系預計藉此機會與美國南加州大學藥學院簽定前項所述之合作備忘錄，期望建立與該院之間的長期合作與交流，進一步加強並拓展本院與國際間學術機構的合作關係網絡。

4. 本人已於 2024/1/4 於本院生化學科分享赴美研究成果，另預計於 2024/3/15 於本院藥學系進行報告分享，並於後續安排幼獅會議進行進修心得分享。

四、致謝

感謝國防醫學院、軍醫局及國防部各位師長、長官和同仁給予我的幫助與鼓勵，也感謝藥學系的各位師長、同事們的協助，才使我有機會獲得這難得的進修機會。特別感謝我的指導教授 Dr. Clay Wang 在美國給予無論生活上或學業上的幫助，並提供一個好的研究環境讓實驗室同仁，甚至他校的合作對象都可以很有效率的互相學習。另外我也要感謝在我赴美攻讀博士過程中留在台灣的家人們，除了疫情造成了長時間的分離，母親的生病更是讓我一度陷入低潮，幸好父親與姐姐一家人的互相支援協助，讓我能無後顧之憂地攻讀博士，最後也感謝我太太謝黎淑滿能夠和我在美國進修博士的期間彼此互相扶持鼓勵，一起努力克服一切挑戰，最後雙雙獲得博士學位，希望未來我們都能運用所學，為國家及社會做出貢獻。



Fig.1 與指導老師 Dr. Clay Wang 及實驗室同仁合影。



Fig.2 在博士進修期間指導高中生及大學生參與學校暑期實驗室研習課程。



Fig.3 帶領暑期高中生及大學生前往 Catalina Island 收集海洋塑膠廢物，並將收集之塑膠廢物帶回實驗室進行升級再造。

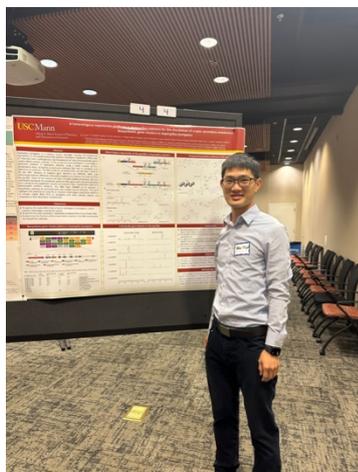


Fig.4 參與研討會張貼研究海報，並獲得 Young Investigator Award，另外在南加州大學藥學院獲頒年度傑出研究助理獎。