

โปรตีนที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อราในเมล็ดข้าวโพด (Zeamatin)

รุ่งตะวัน สุภาพผล, ปร.ด.*

บทคัดย่อ Zeamatin เป็นโปรตีนที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อราที่สกัดได้จากเมล็ดข้าวโพด เดิมเข้าใจว่าเป็น chitinase ต่อมาจึงทราบว่าไม่มีคุณสมบัติของน้ำย่อยอยู่ในตัวเลย ลักษณะโมเลกุลเป็นแบบ amphiphilic ประกอบด้วยส่วนที่เป็นประจุบวก (cationic part) และ hydrophobic part การออกฤทธิ์จะใช้ส่วนที่เป็นประจุบวกจับกับเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อรา แล้วยื่นส่วน hydrophobic แทรกเข้าไปในชั้นไขมันของเยื่อหุ้มเซลล์เกิดเป็น transmembrane pores ทำให้ hyphae มีรอยแตกปริและสารในไซโตพลาสซึมของ hyphae ร่วออกสู่ภายนอกได้

Abstract Antifungal Protein in Maize Seed (Zeamatin)

Roongtawan Supabphol, Ph.D.*

Zeamatin was antifungal protein purified from *Zea mays* seeds. It was previously described as chitinase. The recent evidences was provided that zeamatin was not enzyme at all. This protein had an amphiphilic property containing cationic and hydrophobic parts. It may act by binding to fungal membrane through a cationic region of the molecule followed by insertion of a hydrophobic domain through the lipid bilayer of the membrane to form transmembrane pores. These induced hyphal rupture and the leakage of cytoplasmic material of hyphae.

(MJS 1995 ; 2 : 95 - 97)

กลไกการต่อสู้กับการติดเชื้อของพืชไม่สามารถพึ่งพาระบบภูมิคุ้มกันได้ดังเช่นมนุษย์ วิธีการที่พบได้บ่อยในพืชก็คือ การสังเคราะห์สารซึ่งมักจะเป็นโปรตีนที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพเรียกว่า pathogenesis-related proteins หรือ เรียกสั้น ๆ ว่า PR-proteins ได้แก่ chitinases, glucanases และ ribosome-inactivating protein เป็นต้น พบมากในเมล็ดของพืชหลายชนิด สารเหล่านี้จะช่วยป้องกันเมล็ดรวมทั้งการงอกของเมล็ดจากเชื้อราได้อย่างมีประสิทธิภาพ¹⁻⁵ ตัวอย่างที่

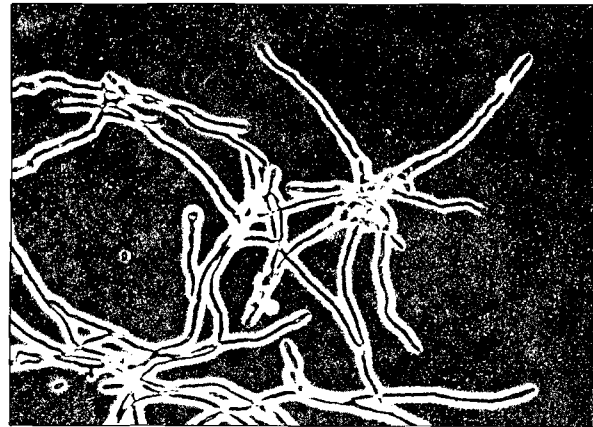
เห็นได้ชัดเจนคือมีเมล็ดพืชหลายชนิดสร้างโปรตีน chitinase ไว้ใช้ป้องกันตัว chitin เป็น β -1, 4-linked polymer ของ N-acetylglucosamine ชนิดสายตรง (linear) ไม่ละลายน้ำ พบมากในเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อรา โดยจะมีการสร้าง chitinase (poly- β -1,4-(2 acetamido-2-deoxy)-D-glucoside glycanohydrolases) ไว้ใช้ในขบวนการ morphogenesis ของเยื่อหุ้มเซลล์⁶ กรณีสิ่งมีชีวิตที่ปราศจาก chitin แต่สามารถสร้าง chitinase ได้นั้น คาดว่าเพื่อประโยชน์ใน

* ภาควิชาสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร
Department of Physiology, Faculty of Medicine, Srinakharinwirot University.

การย่อยอาหาร⁷ หรือมีผลบางอย่างต่อสิ่งแวดล้อม⁸ สำหรับพืชซึ่งไม่มี chitin เป็นส่วนประกอบอยู่ในผนังเซลล์แต่สามารถสร้าง chitinase ได้ก็เพื่อทำลายเชื้อราและแมลงบางชนิดที่มี chitin เป็นส่วนประกอบ รวมทั้งป้องกันการติดเชื้ออื่น ๆ อีกด้วย⁹⁻¹³

เมล็ดข้าวโพด (*Zea mays* seeds) ก็เช่นเดียวกันกับพืชหลายชนิดที่สร้าง chitinase ไว้ใช้ป้องกันการติดเชื้อโดยเฉพาะจากเชื้อรา ในระยะหลังนอกจาก chitinase แล้วมีการค้นพบโปรตีนซึ่งมีฤทธิ์ต้านเชื้อราในเมล็ดข้าวโพด คือ 'ZEAMATIN' zeamatin จำนวน 1 มิลลิกรัมสกัดได้จากเมล็ดข้าวโพด 100 กรัม เดิมเข้าใจว่าเป็น chitinase เนื่องจากได้มาจากการสกัด chitinase ในเมล็ดข้าวโพดให้บริสุทธิ์ (purified) ต่อมาจึงทราบว่า zeamatin เป็นโปรตีนอีกชนิดหนึ่งซึ่งไม่มีคุณสมบัติของน้ำย่อยอยู่ในตัวเลย เนื่องจากสามารถออกฤทธิ์ได้ดีมากแม้ที่อุณหภูมิต่ำถึง 0°ซ ก็ตาม อีกทั้งไม่สามารถย่อย mannan และโปรตีนอื่นที่เป็นส่วนประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์เชื้อราได้ จึงเชื่อว่ากลไกการออกฤทธิ์จะเป็นแบบ non-enzymatic action แม้ว่าปัจจุบันจะยังไม่ทราบลำดับของกรดอะมิโนภายในโมเลกุลก็ตาม แต่ก็ทราบได้จากการสกัดแยกด้วย CM-Sephadex ว่า มีลักษณะโมเลกุลเป็นแบบ amphiphilic ประกอบด้วยส่วนที่เป็นประจุบวก (cationic part) และ hydrophobic part สันนิษฐานว่า zeamatin ใช้ส่วนที่เป็นประจุบวกจับกับเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อรา แล้วยื่นส่วน hydrophobic แทรกเข้าไปในชั้นไขมันของเยื่อหุ้มเซลล์เกิดเป็น transmembrane pores¹⁴ ดังเช่นโปรตีนอื่นที่ทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ของจุลชีพด้วยวิธีเดียวกัน เช่น melittin¹⁵, cecropins¹⁶, magainins¹⁷, thionins^{18,19}, colicin²⁰ และ halocin²¹ เป็นต้น และเมื่อทำการยึดยับด้วยสารกัมมันตรังสี (1-¹⁴C isobutyric acid) ก็จะมีการรั่วของสารในไฮโดรฟาสซึมของ hyphae ของ *Candida albicans* และ *Neurospora crassa* ออกสู่ภายนอก หากใช้กล้องจุลทรรศน์ตรวจดูจะเห็นรอยแตกของ hyphae (hyphal rupture) ได้อย่างชัดเจน โดยพบรอยแตกส่วนใหญ่บริเวณปลายของ hyphae (hyphal tip) หรือส่วนที่อยู่ถัดจากปลายเข้ามา ซึ่งเป็นบริเวณที่ไวต่อแรงต่ง (turgor pressure) ดังแสดงในภาพ 1 ทั้งนี้

พบว่าภาวะ zeamatin-induced hyphal rupture เกิดขึ้นภายใน 15 วินาที ที่อุณหภูมิ 23°ซ²²



ภาพ ก



ภาพ ข

ภาพ 1 แสดงผลของ zeamatin ต่อ hyphae ของ *N. crassa* เมื่ออบเช็ดด้วย

(ก) ribonuclease จากตับอ่อน ขนาด 12 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร และ

(ข) zeamatin ขนาด 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร โดยจุดที่เกิด zeamatin-induced hyphal rupture ในภาพ ข คือ บริเวณลูกศรสีขาวถูกย้อมสีให้เห็นชัดเจนด้วย methylene blue 0.005 %¹⁴

zeamatin มีความคงตัว (stable) มากกว่า 6 สัปดาห์ หากเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°ซ แต่ฤทธิ์การต้านเชื้อราจะถูกทำลายทันทีหากได้รับความร้อนถึง 70°ซ เป็นเวลานาน 15 นาที zeamatin มีคุณสมบัติพิเศษที่แตกต่างจาก chitinase คือ สามารถเสริมฤทธิ์ (synergism) ในการต้านเชื้อรา *C. albicans* และ *N. crassa* กับ nikkomycin Z ได้ ทั้งนี้พบว่า zeamatin

เพียง 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถลดความเข้มข้นต่ำสุดที่ใช้ยับยั้งการเจริญของเชื้อ (minimum inhibitory concentration, MIC) ของ nikkomycin จาก 6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเป็น 0.06 และ 0.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในการยับยั้งเชื้อ *C. albicans* และ *N. crassa* ตามลำดับ โดยที่ zeamatin ในขนาดดังกล่าวไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ ต้องเพิ่มขึ้นเป็น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จึงสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Trichoderma reesei*, *C. albicans* และ *N. crassa* ประสิทธิภาพของ zeamatin จะลดลงหากตัวกลาง (medium) ที่ใช้มีปริมาณอาหาร (เช่น กลูโคส กรดอะมิโน เป็นต้น) และอิเล็กโทรไลต์สูง ดังจะเห็นได้จากการที่ MIC ของ zeamatin เพิ่มขึ้นจาก 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็น 20 และ 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในตัวกลางที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0.03 และ 0.1 โมล ตามลำดับ¹⁴

นอกจากข้าวโพดแล้ว ปัจจุบันสามารถพบ zeamatin และ zeamatin-like protein ได้ในเมล็ดพืชชนิดอื่น ๆ แสดงให้เห็นว่า zeamatin มีใช้เฉพาะที่พบในข้าวโพด แต่เป็น PR-protein ที่พบกระจายอยู่ทั่วไปในพืชได้หลายชนิด^{23,24}

เอกสารอ้างอิง

- Schlumberg A, Mauch F, Vogeli U and Boller T. Plant chitinases are potent inhibitors of fungal growth. *Nature* 1986; 324: 365-7.
- Roberts WK and Selitrennikoff CP. Plant proteins that inactivate foreign ribosomes. *Biosci Rep* 1986; 6: 19-29.
- Roberts WK and Selitrennikoff CP. Plant and bacterial chitinases differ in antifungal activity. *J Gen Microbiol* 1988; 134: 169-76.
- Mauch F, Mauch-Mani B and Boller T. Antifungal hydrolases in pea tissue II. Inhibition of fungal growth by combinations of chitinase and α -1,3-glucanase. *Plant Physiol* 1988; 88: 936-42.
- Rigden J and Coutts R. Pathogenesis-related proteins in plants. *Trends Genetics* 1988; 4: 87-9.
- Gooday GW. Biosynthesis of the fungal wall - mechanism and implications. *J Gen Microbiol* 1977; 99: 1-11.
- Danulat E and Kausch H. Chitinase activity in the digestive tract of the cod. *J Fish Biol* 1984; 24: 125-34.
- Oranusi NA and Trinci APJ. Growth of bacteria on chitin, fungal cell walls and fungal biomass, and the effect of extracellular enzymes produced by these cultures on the antifungal activity of amphotericin B. *Microbios* 1985; 43: 17-30.
- Pegg GF and Young DH. Purification and Characterization of chitinase enzymes from healthy and *Verticillium albo-atrum*-infected tomato plants, and from *V. albo-atrum*. *Physiologic Plant Patho* 1982; 21: 389-409.
- Boller T, Gehri A, Mauch F and Vogeli U. Chitinase in bean leaves: induction by ethylene, purification, properties, and possible function. *Planta* 1983; 157: 22-31.
- Boller T. Induction of hydrolases as a defence reaction against pathogens. In *Cellular and Molecular Biology of Plant Stress*, 1985; p 247-262. Edited by Key JL and Kosuge, New York: Alan R Liss, Inc.
- Abeles FB, Bosshart RP, Forrence LE and Habig WH. Preparation and purification of glucanase and chitinase from bean leaves. *Plant Physiol* 1970; 47: 129-34.
- Bell AA. Biochemical mechanisms of disease resistance. *Annual Rev Plant Physiol* 1981; 32: 21-81.
- Roberts WK and Selitrennikoff CP. Zeamatin, an antifungal protein from maize with membrane-permeabilizing activity. *J Gen Microbiol* 1990; 136: 1771-78.
- Mackler BF and Kreil G. Honey bee venom melittin. *Inflammation* 1977; 2: 55-65.
- Steiner H, Hultmark D, Engstrom A, Bennich H, Boman HG. Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. *Nature* 1981; 292: 246-8.
- Zaslloff M. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1987; 84: 5449-53.
- Okada T and Yoshizumi H. The mode of action of toxic protein in wheat and barley on brewing yeast. *Agricul Biologic Chem* 1973; 37: 2289-94.
- Bohlmann H, Clausen S, Behnke S, Giese H, Hiller C, Reimann-Philipp U, Schrader G, Barkholt V and Apel K. Leaf-specific thionins of barley-a novel class of cell wall proteins toxic to plant-pathogenic fungi and possibly involved in the defence mechanism of plants. *EMBO J* 1988; 7: 1559-65.
- Parker MW, Pattus F, Tucker AD and Tsernoglou D. Structure of the membrane-pore-forming fragment of colicin A. *Nature* 1989; 337: 93-6.
- Torreblanca M, Meseguer I and Rodriguez-Valera F. Halocin H6, a bacteriocin from *Haloferax gibbonsii*. *J Gen Microbiol* 1989; 135: 2655-61.
- Wessels JGH. A steady-state model for apical wall growth in fungi. *Acta Botanica Neerlandica* 1988; 37: 3-16.
- Malehorn DE, Borgmeyer JR, Smith CE and Shah DM. Characterization and expression of an antifungal zeamatin-like protein (Zlp) gene from *Zea mays*. *Plant Physiol* 1994; 106(4): 1471-81.
- Vigers AJ, Roberts WK and Selitrennikoff CP. A new family of plant antifungal proteins. *Molecular Plant-Microbe Interac* 1991; 4: 315-23.