

แลนทิไบโอติก : การสังเคราะห์ และฤทธิ์ต้านจุลชีพ

ศิริวุฒิ สุขชี และ ชุมพล สกลสวัสดิ์

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

แลนทิไบโอติกเป็นเพปไทด์ต้านจุลชีพซึ่งส่วนใหญ่ผลิตจากเชื้อสมาชิกกลุ่มแบคทีเรีย จัดอยู่ในคลาสที่ 1 ของแบคทีเรียโอซิน เพปไทด์สำคัญคือโนซิน, แลกทิซิน 3147 และสับทิลิน เพปไทด์สายหลักประกอบด้วยโครงสร้างแลนทิโอนิน หรือเมทิลแลนทิโอนินที่เกิดขึ้นในระหว่างการดัดแปลงกรดอะมิโน ภายหลังการแปลรหัส ออกฤทธิ์กว้างต่อเชื้อแบคทีเรียต่าง ๆ การออกฤทธิ์ต้านจุลชีพขึ้นกับชนิดและคุณสมบัติของสายเพปไทด์ ล่าสุดแลนทิไบโอติกบางชนิดแสดงศักยภาพในการประยุกต์เพื่อกำจัดเชื้อก่อโรคดื้อยาซึ่งอาจลดปัญหาการดื้อยาด้านจุลชีพได้ บทความนี้ได้นำเสนอถึงขั้นตอนการสังเคราะห์ และฤทธิ์ต้านจุลชีพของแลนทิไบโอติก รวมทั้งศักยภาพในการนำไปพัฒนาต่อยอดเชิงการแพทย์ได้ **เชียงใหม่เวชสาร 2560;56(4):231-41.**

คำสำคัญ: โพรไบโอติก แบคทีเรียแลคติกแอซิดแบคทีเรีย แลนทิไบโอติก ต้านจุลชีพ การประยุกต์ทางการแพทย์

บทนำ

ปัจจุบันการดื้อยาด้านแบคทีเรียพบได้บ่อยและทวีความรุนแรงขึ้น จนเป็นปัญหาสำคัญของโลก โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อดื้อยาหลายขนานชนิดรุนแรง การระบาดในโรงพยาบาลของเชื้อดังกล่าวเป็นผลมาจากการพัฒนาการดื้อยาของเชื้อจนไม่สามารถหายาในปัจจุบันรักษาได้อย่างเหมาะสม การค้นหาต้านแบคทีเรียชนิดใหม่ที่ไม่เป็นพิษต่อร่างกายโฮสต์ ไม่ทำลายเชื้อประจำถิ่นในลำไส้ และไม่เกิดการดื้อยาของเชื้อก่อโรคเร็วเกินไป จึงเป็นโจทย์ที่ท้าทายของนักวิจัย ในวงการวิทยาศาสตร์

อาหารได้ค้นคว้าเกี่ยวกับสารต้านจุลชีพที่เรียกว่า “แบคทีเรียโอซิน (bacteriocins)” และนำมาใช้ยับยั้งเชื้อก่อโรคทางอาหาร (foodborne pathogens) และเชื้อที่ทำให้อาหารเน่าเสีย (spoilage bacteria) เป็นเวลานานพอสมควรแล้ว Cleveland และคณะ (1) ให้คำจำกัดความว่าแบคทีเรียโอซินเป็นสารกลุ่มโปรตีนหรือเพปไทด์ (peptide) ที่ออกฤทธิ์ต้านจุลชีพ สร้างจากไรโบซอม เป็นสารเมตาบอไลต์ชนิดทุติยภูมิ (secondary metabolites) ถูกค้นพบครั้งแรกในปี 1925 โดยโนซินที่เป็น

แบคทีเรียโอรินตัวแรกที่ผลิตจากเชื้อในกลุ่มแลคติกแอซิดแบคทีเรีย (lactic acid bacteria หรือ LAB) ซึ่งมีบทบาทเป็นเชื้อโพรไบโอติก (probiotics) ที่นำมาใช้เป็นสารกันบูดในอาหาร (food preservatives) เป็นเวลานานแล้ว เนื่องจากแบคทีเรียโอรินผลิตจากเชื้อที่ถูกจัดว่าปลอดภัยต่อการบริโภค (Generally Regarded As Safe หรือ GRAS) (2) ไม่เป็นพิษต่อโฮสต์ หรือส่งผลกระทบต่อเชื้อประจำถิ่นในลำไส้ของโฮสต์ (host) แต่อย่างใด แบคทีเรียโอรินบางชนิดมีศักยภาพในการพัฒนาเป็นสารต้านจุลชีพได้ จึงเป็นที่มาของการศึกษาฤทธิ์ของแบคทีเรียโอริน เพื่อประยุกต์ทางการแพทย์ ทันทแพทย์ สัตวแพทย์ เกษษกรรม และเทคโนโลยีชีวภาพ บทความที่ตีพิมพ์ทางวิชาการนี้จะนำเสนอถึงความ เป็นมา คุณสมบัติ และการประยุกต์ใช้ของแลนทิไบโอติก (lantibiotic) ซึ่งจัดเป็นแบคทีเรียโอริน คลาสที่ 1 (Class I bacteriocins) ดังที่จะกล่าวต่อไป

แบคทีเรียโอริน

ในปี 1993 Klaenhammer และคณะ (3) เป็นนักวิจัยกลุ่มแรกที่ได้จำแนกแบคทีเรียโอรินทั่วโลกเป็นคลาสต่าง ๆ ต่อมามีนักวิจัยหลายคนได้ปรับปรุงเพิ่มเติมการจัดจำแนกแบคทีเรียโอรินอย่างต่อเนื่อง (4,5) จนในปี 2007 Nes และคณะ (6) ได้จำแนกแบคทีเรียโอรินให้ทันสมัยยิ่งขึ้น เรียกว่า “Nes’s classification” ซึ่งบทความนี้จะนำเสนอเฉพาะความสำคัญของแลนทิไบโอติกหรือแบคทีเรียโอริน คลาส ที่ 1 เท่านั้น

แบคทีเรียโอริน คลาสที่ 1 หรือแลนทิไบโอติก เป็นเพปไทด์ขนาดเล็ก ประมาณ 19-38 ลำดับกรดอะมิโน หรือน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 5 กิโลดาลตัน (kDa) หนควรร้อน เกิดจากการเปลี่ยนแปลงโมเลกุลภายหลังการแปลรหัส (post-translational

modification) ทำให้เกิดโครงสร้างแลนทิโอนิน (lanthionine) และเมทิลแลนทิโอนิน (methyllanthionine) โดยสามารถจำแนกกลุ่มย่อยได้เป็น

สับคลาสเอ (Subclass A) เป็นเพปไทด์สายยาวที่มีปลายโค้งงอ ประจุสุทธิเป็นบวก น้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 4 กิโลดาลตัน สามารถจำแนกตามเอนไซม์ที่ใช้สังเคราะห์เพปไทด์สายหลักได้เป็นกลุ่มย่อยที่ 1 คือแลนทิไบโอติกที่อาศัยการทำงานของเอนไซม์ดีไฮเดรตาส (dehydratases หรือ LanB), ไซเคเลส (cyclases หรือ LanC) และเซรีนโปรทีเอสที่คล้ายสับทิลิน (subtilisin-like serine proteases หรือ LanP) เช่น ไนซิน เอ (nisin A) ผลิตจากเชื้อ *Lactococcus lactis* ATCC11454, สับทิลิน (subtilin) ผลิตจากเชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC6633, เอพิเดอร์มิน (epidermin) ผลิตจากเชื้อ *Staphylococcus epidermidis* Tu3298, แกลลิเดอร์มิน (gallidermin) ผลิตจากเชื้อ *Staphylococcus gallinarum* Tu3928, มิวทาซิน 1140 (mutacin 1140) ผลิตจากเชื้อ *Streptococcus mutans* JH1000, เพป 5 (pep 5) ผลิตจากเชื้อ *S. epidermidis* 5 เป็นต้น (7) ส่วนกลุ่มย่อยที่ 2 อาศัยเอนไซม์เพียงตัวเดียว คือ LanM ก่อนถูกส่งออกนอกเซลล์ผ่านทางโปรตีนที่มีหน้าที่ขนส่งเพปไทด์ออกจากเซลล์โดยอาศัยพลังงานจากเอทีพี (ABC transporter) ด้วยการทำงานของเอนไซม์ LanT เช่น แลกทิซิน 481 (lacticin 481) ผลิตจากเชื้อ *L. lactis* CNRZ481, แลกทิซิน 3147 (lacticin 3147) ผลิตจากเชื้อ *L. lactis* DPC3147, แลกโทซิน เอส (lactocin S) ผลิตจากเชื้อ *Lactobacillus sake* L45, ไซโทไลซิน (cytolysin) ผลิตจากเชื้อ *Enterococcus faecalis* DS16, คาร์โนซิน ยู 149 (carnocin U149) ผลิตจากเชื้อ *Carnobacterium piscicola* และสับแลนซิน 168 (sublancin 168) ผลิตจากเชื้อ *B. subtilis* 168 เป็นต้น

สับคลาส บี (Subclass B) เป็นเปปไทด์ที่รูปร่างคล้ายก้อนกลม (globular peptide) มีประจุสุทธิเป็นศูนย์ น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 1.8-2.1 กิโลดัลตัน (3) โครงสร้างมีความซับซ้อนขึ้นทำให้สายเปปไทด์มีความแข็งแรงมากขึ้น ทนต่อการทำลายของเอนไซม์โปรติเอส (protease) และทนต่อความร้อน (7) เช่น ซินนาไมซิน (cinnamycin) ผลิตจากเชื้อ *Streptomyces cinnamoneus* เมอร์ซาคิดิน (mersacidin) ผลิตจากเชื้อ *B. subtilis* HIL Y-85 และแอคทาการ์ดิน (actagardine) ผลิตจากเชื้อ *Actinoplanes* เป็นต้น

ปัจจุบันมีการจำแนกแลนทิไบโอติกในสับคลาสที่ 2 นี้เพิ่มตามลักษณะของสายเปปไทด์เช่น

- เปปไทด์ชนิดวง (cyclized peptides) คล้ายเป็นวงต่อกัน นั่นคือส่วนปลาย N กับส่วนปลาย C ของสายเปปไทด์เชื่อมกันด้วยพันธะเปปไทด์ เช่น คาร์โนไซคลิน เอ (carnocyclin A) (8)

- เปปไทด์แบบเส้นที่มีหมู่อะโซลีน (linear azol(in)e-containing peptides หรือ LAPs) เป็นเปปไทด์ที่มีวงเฮเทอโรไซคลิก (heterocyclic ring) ของหมู่ไทอะโซล (thiazole) และออกซาโซล หรือเมทิลออกซาโซล (oxazole หรือ methyloxazole) เช่น สเตรปโตไลซิน เอส (streptolysin S) (9)

แซคทิไบโอติก (Sactibiotics) หรือแซคทิเพปไทด์ เป็นเปปไทด์ที่มีหมู่ซัลเฟอร์เชื่อมอยู่ ณ ตำแหน่ง

คาร์บอนที่ 1 ทำให้โครงสร้างคล้ายเข็มกลัดติดผม (hairpin) เช่น สับทิลโลซิน เอ (subtilosin A) (10)

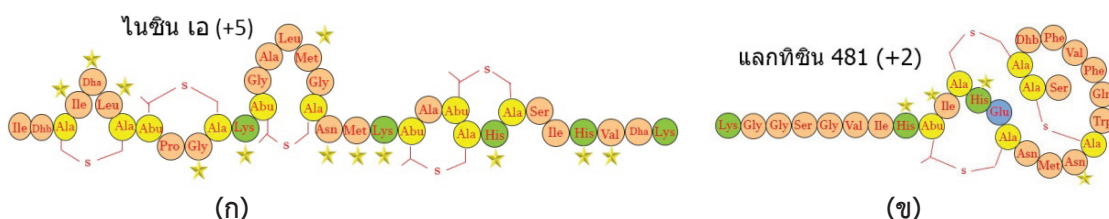
ไกลโคซิน (Glycocins) เป็นแบคเทอริโอซินที่มีการเติมหมู่ไกลโคซิล (glycosyl group) ให้กับกรดอะมิโนเช่น ไกลโคซิน เอฟ (glycocin F) ผลิตจากเชื้อ *Lactobacillus plantarum* KW30 รายงานครั้งแรกโดย Stepper และคณะ ในปี 2011 (11) ส่วนปลาย C เป็นหางแบบยืดหยุ่นที่โมทิฟที่จับกับรีเซปเตอร์ (receptor) ลำดับกรดอะมิโนคือ YDSGT

เปปไทด์ลาซโซ (Lasso peptides) เป็นเปปไทด์ที่มีพันธะเอไมด์ (amide bond) เชื่อมกับกรดอะมิโนตัวแรกในเปปไทด์สายหลัก กับกรดอะมิโนชนิดประจุลบ ณ ลำดับที่ 7 ถึง 9 กลายเป็นวงโพลีเปปไทด์ (polypeptide ring) มีเพียงส่วนปลาย C ที่เป็นสายตรง (12) เช่น ไมโครซิน เจ 25 (microcin J 25) ผลิตจากเชื้อ *Escherichia coli*

ตัวอย่างโครงสร้างตัวแทนของสับคลาสทั้งสองคือโนซิน เอ และแลกทิซิน 481 แสดงดังรูปที่ 1

การสังเคราะห์แลนทิไบโอติก

กระบวนการสังเคราะห์ควบคุมโดยการทำงานของเอนไซม์ฮิสทีดิน ไคเนส (histidine kinase หรือ LanK) และโปรตีนทำหน้าที่ควบคุม (regulatory protein หรือ LanR) เริ่มจากเมื่อสังเคราะห์แลนทิ-



รูปที่ 1. ตัวอย่างโครงสร้างของแบคเทอริโอซินในคลาสที่ 113 (ก) โนซิน เอ (ข) แลกทิซิน 481 ที่แสดงถึงหมู่แลนทิโอนิน และเมทิลแลนทิโอนิน การจัดเรียงตัวของกรดอะมิโน และประจุสุทธิ สีเขียวแสดงถึงกรดอะมิโนที่มีประจุเป็นบวก และสีฟ้าแสดงถึงกรดอะมิโนที่มีประจุเป็นลบ ขณะที่สีเหลืองแสดงถึงกรดอะมิโนที่มีหมู่แลนทิโอนิน (เกิดพันธะระหว่าง Ala-Ala) และเมทิลแลนทิโอนิน (เกิดพันธะระหว่าง Abu-Ala) ส่วนสีแสดงถึงกรดอะมิโนอื่น ๆ

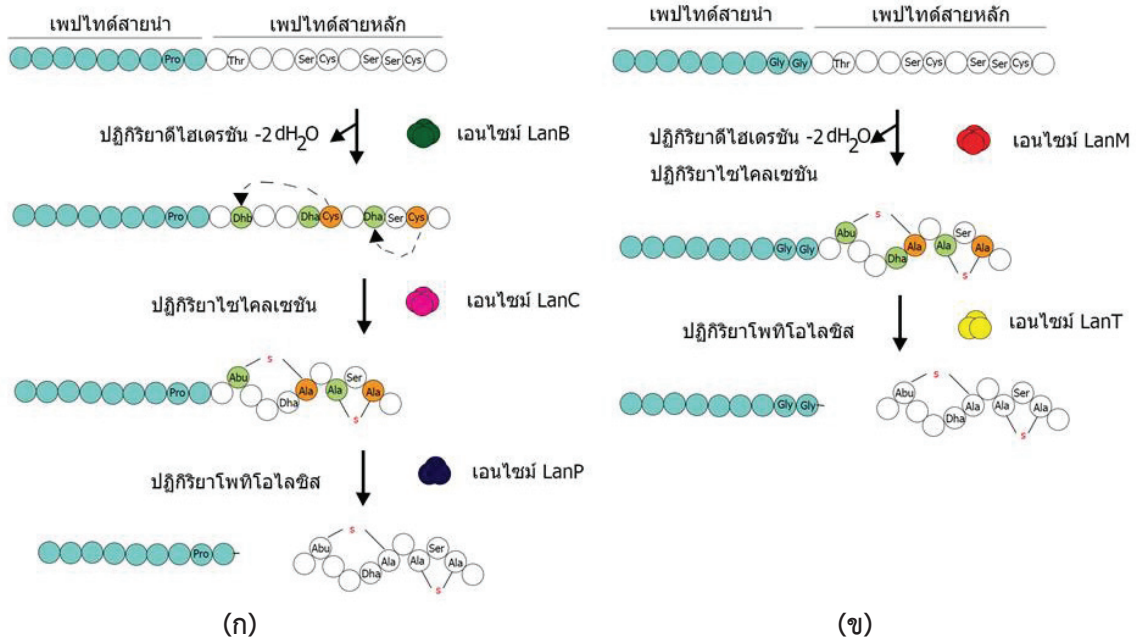
ไบโอติกขึ้นจากยีนโครงสร้าง lanA จะเรียกสายนี้ว่า “พรีเพปไทด์ (prepeptide)” บริเวณส่วนปลาย N ยังคงมีลำดับเพปไทด์สายนำ (leader sequence) อยู่ จึงยังไม่แสดงฤทธิ์ต้านจุลชีพหรือ “พรีแลนทิไบโอติก (prelantibiotic)” และเรียกเพปไทด์สายหลักที่แสดงฤทธิ์ต้านจุลชีพว่า “โพรเพปไทด์ (propeptide) หรือแลนทิไบโอติก” เมื่อสลายน้ำ ณ ตำแหน่งเซรีน และทรีโอนีนที่เกิดปฏิกิริยาเชื่อมโยงกัน (cross-linking) โดยการทำงานอย่างจำเพาะของเอนไซม์ LanB ทำให้เกิดหมู่แลนทิโอนีน และเมทิลแลนทิโอนีนตามลำดับ เอนไซม์ไซเคลส LanC ทำให้เกิดการรวมเป็นวง (cyclization) ของซิสเทอีนต่อ Dha และ Dhb ขณะที่ลำดับเพปไทด์สายนำจะถูกตัดอย่างจำเพาะจากการทำงานของเอนไซม์เซรีน โปรติเอส LanP ทำให้เพปไทด์สายหลักหลุดออกจากเซลล์ กลายเป็นเพปไทด์ที่ออกฤทธิ์ได้ซึ่งพบในกรณีของโนซิน เอพิเดอร์มิน สับทิลิน และเพป5 (7) ทั้งนี้ De Vos และคณะ ในปี 1995 (14) เสนอว่าเพปไทด์สายนำของแลนทิไบโอติกกลุ่มนี้ มีคุณสมบัติชอบน้ำ (hydrophilic) ประจุมลพิษเป็นบวกรหรือลบ มีลำดับกรดอะมิโนอนุรักษ์เช่น FNLDV หรือกรดอะมิโนที่อนุรักษ์ต่อตำแหน่งเช่น เซรีนในลำดับที่ 63 และโพรลีนในลำดับที่ 23 เป็นต้น ขณะที่กรณีของสับคลาส บี เช่น แลกทิซิน 481 แลกโทซิน เอส ไฮ-โทไลซิน และเมอร์ซาซิดิน จะเกิดการสลายน้ำทำให้เกิดวงโดยการทำงานของเอนไซม์ LanM แทน (15) เป็นที่น่าสนใจว่ากรณีของแลกทิซิน 3147 มีการรายงานยืนยันกำหนดการสร้าง LanM อยู่ถึง 2 ชุด ทำให้เกิดเป็นแลนทิไบโอติกที่มี 2 สายเพปไทด์ (two-component lantibiotic) โดย 1 สาย มีหน้าที่ในการสลายน้ำของ hydroxyamino acids ส่วนอีกสายทำหน้าที่เกิดโครงสร้างวงไทโอเอเทอร์ คล้ายกับเอนไซม์ LanB และ LanC ตามลำดับ ก่อนเกิดการตัดลำดับเพปไทด์สายนำโดยเอนไซม์ LanT ซึ่ง

ทำหน้าที่ตัดและขนส่งเพปไทด์ออกจากเซลล์ โดยอาศัยพลังงานจากเอทีพี (ATP-binding cassette transporter/processing protein หรือ ABC) เพปไทด์สายนำของแลนทิไบโอติกกลุ่มนี้จะมีประจุมลพิษเป็นลบ และมีลำดับกรดอะมิโนที่จำเพาะต่างไปจากกลุ่มย่อยที่ 1 เช่นลำดับของ ELS หรือ EVS และ EL หรือ EM ในเพปไทด์สายนำ (16) และจำเป็นต้องอาศัยการตัดของเอนไซม์เพปทิเดส (LanM) ณ ตำแหน่งกรดอะมิโนที่จำเพาะซึ่งเหมือนกับการทำงานที่พบในเพปไทด์สายนำของแบคทีเรียโอซินคลาสที่ 2 ตัวอย่างการสังเคราะห์แลนทิโอนีนทั้ง 2 แบบแสดงดังในรูปที่ 2

กลไก และขอบเขตการออกฤทธิ์ต้านจุลชีพ (Mode of action and spectrum)

1. การจับกับ lipid II เพื่อยับยั้งการสังเคราะห์ผนังเซลล์ และ/หรือทำให้เกิดรูรั่วของเซลล์ (pore formation)

ตัวอย่างสำคัญคือโนซิน ออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อต่อเซลล์จุลชีพเป้าหมายได้กว้างเนื่องจากกลไกการทำให้เกิดรูบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์จากการจับกับ lipid II ซึ่งเป็นสารสำคัญของการสังเคราะห์ผนังเซลล์ โดยจับบริเวณหมู่ฟอสเฟตที่เชื่อมกับ lipid II ทำให้ไม่สามารถเรียงต่อจนกลายเป็นโมเลกุลมิวรินแต่ละโมโนเมอร์ในการสังเคราะห์ผนังเซลล์ได้ ก่อนทำให้เกิดรูรั่วของเยื่อหุ้มเซลล์ ส่งผลให้เกิดการขับออกอย่างรวดเร็วของอออน กรดอะมิโน และเอทีพี เกิดการเปลี่ยนแปลงของความต่างศักย์ (membrane potential) และการเปลี่ยนแปลงของความเป็นกรด-ด่าง (pH gradient) และทำให้เซลล์เป้าหมายตายอย่างรวดเร็วในที่สุด จึงเรียกได้ว่าเป็นเพปไทด์ที่ออกฤทธิ์บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ (membrane-active peptide) รายงานของ Steven และคณะ ในปี



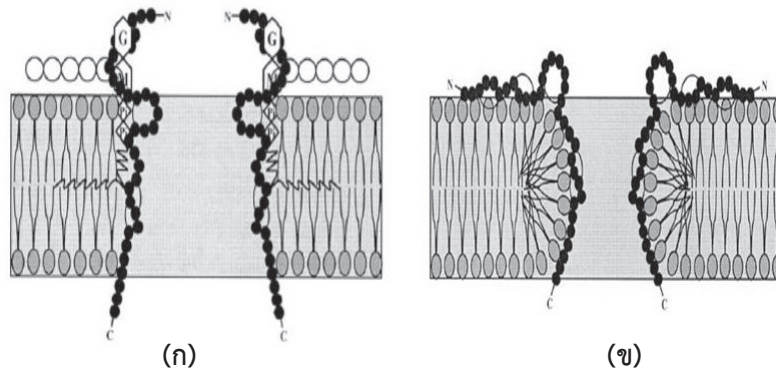
รูปที่ 2. ขั้นตอนการเกิดเพปไทด์สายหลักของ (ก) ไนซิน เอ17 และ (ข) นูกาสิน เอ (Nukasin A) (18)

1991 พบว่าไนซินแสดงฤทธิ์ต้านแบคทีเรียแกรมลบ เช่น *E. coli* โดยการทำให้เกิดความเสียหายของเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ (19) ส่วนการศึกษาของ Oren และคณะ ในปี 1998 (20) เสนอว่าไนซินมีผลต่อการสังเคราะห์เพปไทโดไกลแคน และต่อคุณสมบัติในการเป็นเยื่อเลือกผ่านของเยื่อหุ้มเซลล์แบคทีเรีย โดยทำให้เกิดรูแบบไม่จำเพาะต่อสารได้ในเชื้อ *Staphylococci* ไนซินใช้เวลาเพียง 1/1000 วินาที ในการเกิดรู รูปแบบที่ไนซินใช้ขณะแทรกตัวผ่านไลปิด ไบเลเยอร์ (lipid bilayer) เรียกว่า “barrel-stave model” ทำให้เกิดเป็นรูรั่วที่ไม่จำเพาะต่อโมเลกุลเป้าหมาย โดยไนซินจะเรียงแต่ละโมโนเมอร์ของเพปไทด์ลักษณะคล้ายถังเบียร์ไม้ ซึ่งแรงขับโปรตอนมีส่วนช่วยส่งเสริมให้เกิดรูได้เร็วขึ้นด้วย ขณะที่ “wedge model” เป็นรูปแบบที่เสนอว่าโมเลกุลของไนซินใช้ส่วนปลาย C จับกับ lipid II ก่อนนำส่วนปลาย C ของสายเพปไทด์แทรกผ่านส่วนไม่ชอบน้ำของไลปิด ไบเล-

เยอร์เข้าไปด้านในเซลล์จนไนซินแทรกผ่านเข้าไปขวางและเข้าเซลล์ได้ การจับนี้เป็นตัวกระตุ้นให้เกิดรู ณ ระดับความเข้มข้นของไนซินต่ำเพียงนาโนโมลาร์ ขณะที่ไนซิน ณ ระดับความเข้มข้นสูงถึงไมโครโมลาร์สามารถทำให้เกิดรูโดยไม่ต้องมีไลปิด II โดยใช้เวลาเพียงมิลลิวินาทีเท่านั้น (21)

2. การเกิดรูวบนเยื่อหุ้มเซลล์จากแลนทิไบโอติกสายคู่จากการจับเพียงสายเดียว

ในขณะที่แลนทิไบโอติกในสับคลาส บี เช่น แลกทิซิน 3147 ประกอบด้วยเพปไทด์ 2 สาย ผลิตจากเชื้อ *L. lactis* เพปไทด์สายที่ 1 (LtnA1) มีการเกิดหมู่แลนทิโอนีน มีลักษณะโค้งงอรวมกัน (ลักษณะบ่งชี้ความเป็นแลนทิไบโอติกสับคลาส บี) ส่วนเพปไทด์สายที่ 2 (LtnA2) มีลักษณะเป็นสายเพปไทด์มากกว่าเพปไทด์ทั้ง 2 สายออกฤทธิ์เสริมกัน ณ ความเข้มข้นระดับนาโนโมลาร์ รูปแบบในการออกฤทธิ์ 3 ขั้นตอนของแลกทิซิน 3147 ได้แก่ เพปไทด์สายที่ 1 ของแลกทิซินเข้าจับกับไลปิด II ซึ่งเป็น



รูปที่ 3. รูปแบบการเกิดรูที่เยื่อหุ้มเซลล์แบบที่เรียกอย่างไม่จำเพาะต่อโมเลกุลเป้าหมาย (21) (ก) แบบ Barrel-stave (ข) แบบ Wedge

ขั้นตอนที่สำคัญที่สุด จากนั้นแลกทิซินทั้ง 2 สาย เพปไทด์เกิดการสร้างโครงสร้างเชิงซ้อนที่เสถียรระหว่างไลปิด ทุ กับแลกทิซินเพปไทด์สายที่ 1 และ 2 ก่อนนำส่วนปลาย C ของเพปไทด์สายที่ 2 แทรกเข้าไปภายในเยื่อหุ้มเซลล์ และทำให้เกิดเป็นรูขนาดประมาณ 0.6 นาโนเมตร โดยมีส่วนปลาย N แทรกอยู่ในส่วนตรงกลางของเยื่อหุ้มเซลล์ทำหน้าที่จับกับโครงสร้างเชิงซ้อนดังกล่าว (21)

3. การเกิดรูรั่วบนเยื่อหุ้มเซลล์ในรูปแบบ Huge-toroidal

แบคทีเรียโอซินบางชนิดมีกลไกการออกฤทธิ์ต่างไปจากการจับกับไลปิด ทุ หรือจับกับเอนไซม์ในระบบแมนโนส ฟอสโฟทรานสเฟอเรส เช่น แลกทิซิน คิว (Lacticin Q) ที่จับกับเยื่อหุ้มเซลล์โดยไม่จำเพาะต่อโมเลกุลใด ๆ แต่ใช้การเคลื่อนตัวแทรกเข้าไปด้วยคุณสมบัติของส่วนหัวของฟอสโฟลิปิด จนขวางกลายเป็นช่องรูระหว่างเยื่อหุ้มเซลล์ ชักน้ำให้สารต่าง ๆ อีออน ATP และโปรตีนขนาดเล็กผ่านรูที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 4.6-6.6 นาโนเมตรได้ และเพปไทด์สามารถเลื่อนกลับไปได้ (flip-flop) ด้านใน-ด้านนอกของเยื่อหุ้มเซลล์กับการขวางระหว่างเยื่อหุ้มเซลล์ได้ เรียกแบบนี้ว่า “Huge-toroidal model” (22)

4. การจับ lipid II เพื่อยับยั้งการสังเคราะห์เปปทิโดไกลแคนของแลนทิไบโอติกสับคลาส บี

ตัวอย่างเช่น เมอร์ซาคาร์ดิน และแอกทาการ์ดิน การออกฤทธิ์ของแลนทิไบโอติกกลุ่มนี้จะเข้าจับกับไลปิด ทุ เพื่อป้องกันการเกิดโพลิเมอร์เชนของเพปทิโดไกลแคน บริเวณของ GlcNAc กับ MurNAc ส่งผลให้ไม่มีการสลายเอทีพี (ATP) เนื่องจากไม่มีการเชื่อมต่อของแต่ละโมโนเมอร์ โดยไม่เกี่ยวข้องกับสายเพนทาเพปไทด์ และชักน้ำให้เกิดเซลล์ตอบสนองต่อความเครียดแทน (stress response) (23) โดยไม่เกิดรูได้

5. การเกิดรูรั่วแบบจำเพาะต่อประจุบนเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียเป้าหมาย

เป้าหมายหลักของเพปไทด์ชนิดประจุสุทธิเป็นบวก คือเยื่อหุ้มเซลล์โดยการเกิดการทำลายแรงขับโปรตอน (proton motive force) จนเกิดรูรั่วได้ ซึ่งส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-ด่าง และความต่างศักย์ ขับอีออนออกจากเซลล์ ทำให้เซลล์ตาย กระบวนการที่อาศัยความต่างศักย์ที่เปลี่ยนแปลงของแลนทิไบโอติกสับคลาสเอ นี้ไม่ต้องการโปรตีนรีเซปเตอร์ที่จำเพาะแต่อย่างใด ซึ่งต่างจากการทำงานของแบคทีเรียโอซินคลาสที่ 2 ที่ต้องทำปฏิกิริยากับโปรตีนรีเซปเตอร์ก่อนแทรก

สายเพปไทด์ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์โดยไม่ขึ้นกับความต่างศักย์ (24)

กลไกการป้องกันเซลล์ที่ผลิตแบคทีเรียโอซินจากฤทธิ์ด้านจุลชีพ

โปรตีนทำหน้าที่เป็นภูมิคุ้มกัน (lantibiotic immunity protein) ป้องกันเซลล์ที่ผลิตแลนทิไบโอติก เองจากฤทธิ์ด้านจุลชีพประกอบไปด้วย 2 ส่วน คือ LanEFG และ LanI หรือโปรตีนที่ทำหน้าที่ปกป้องเซลล์ที่ผลิตแบคทีเรียโอซินได้แก่

- โปรตีนภูมิคุ้มกัน LanI

ตัวอย่างเช่น Pepl ที่กำหนดการสร้างผ่านทางโอเปอรอนของเพป5 มีลำดับกรดอะมิโน 69 ลำดับ ส่วนปลาย N ไม่ชอบน้ำ และส่วนปลาย C มีความชอบน้ำมาก และจัดเป็นโปรตีนชนิดที่ทำงานบนเยื่อหุ้มเซลล์ (membrane-associated protein) (26) อยู่บริเวณด้านนอกของเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้เกิดขวางการทำให้เกิดรูของเพป5 สามารถเกิดภูมิคุ้มกันข้ามเพปไทด์ได้ก็ต่อเมื่อมีความเหมือนหรือใกล้เคียงของเพปไทด์ จึงสามารถขัดขวางการทำงานของเอพิเตอร์มินได้ด้วย ส่วนโปรตีนภูมิคุ้มกันของสับทิลิน และไนซินที่พบความเหมือนกันของลำดับกรดอะมิโนอยู่ประมาณร้อยละ 60 จึงเกิดปฏิกิริยาภูมิคุ้มกันข้ามระหว่างกันได้ (27)

โปรตีนภูมิคุ้มกัน LanFEG

นอกจาก LanT แล้วที่ทำหน้าที่เป็นตัวขนส่งเพปไทด์ออกจากเซลล์ โดยอาศัยพลังงานจากเอทีพี ยังมีอีกยีนที่กำหนดการสร้างโปรตีน LanF ที่สามารถจับกับเอทีพีด้านในของเยื่อหุ้มเซลล์ได้ ขณะที่ LanE และ LanG มีบทบาทต่อเยื่อหุ้มเซลล์ในการทำหน้าที่ร่วมกับ LanF คล้ายกับตัวขนส่งเพปไทด์ออกจากเซลล์ โดยอาศัยพลังงานจากเอทีพี ตัวอย่างเช่น

กรณีของไนซิน (28) เอพิเตอร์มิน (29) แลกทิซิน-481 และเมอร์ซาซิดิน โปรตีน LanFEG นี้ทำหน้าที่ป้องกันการเกิดรูโดยรักษาความเข้มข้นของแลนทิไบโอติกบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ให้ต่ำกว่าระดับที่ทำให้เกิดรูได้ (29)

การวิจัยและพัฒนาแลนทิไบโอติกเพื่อประโยชน์ทางการแพทย์

บทบาทในการป้องกันการติดเชื้อ

ไนซินได้รับอนุมัติจากข้อตกลงร่วมระหว่างองค์การเกษตร และอาหารแห่งสหประชาชาติกับองค์การอนามัยโลกในปี 1969 ว่าปลอดภัยในการนำมาใช้แต่งอาหาร รวมทั้งกันบูดในอาหาร ไนซิน เอ มีคุณสมบัติเป็นเพปไทด์ด้านจุลชีพชนิดประจุสุทธิเป็นบวก ออกฤทธิ์ด้านจุลชีพได้กว้างต่อแบคทีเรียแกรมบวก เช่น ฤทธิ์ต่อเชื้อ Lactococci, Streptococci, Staphylococci, Enterococci, Listeria, Mycobacteria, Bacilli และ Clostridia (30) มีรายงานถึงฤทธิ์ด้านการเกิดไบโอฟิล์มของเชื้อก่อโรคได้อีกด้วย และมีความเป็นพิษต่ำมากต่อเซลล์มนุษย์ ความเข้มข้นที่ออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อ (31,32) จากบทบาทของไนซินที่ใช้อย่างกว้างขวาง และปลอดภัยในอุตสาหกรรมอาหารเพื่อป้องกันเชื้อปนเปื้อน จึงมีนักวิจัยหลายคณะที่นำแบคทีเรียโอซินมาศึกษาศักยภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค ไม่ว่าจะเป็นการติดเชื้อดื้อยา หรือที่สัมพันธ์กับไบโอฟิล์มของเชื้อ เพื่อหลีกเลี่ยงการดื้อยาด้านจุลชีพ (33,34) มีรายงานว่าไนซินแสดงฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกทั้งเชื้อ *S. aureus* สายพันธุ์ดื้อยาเมทิซิลลิน เชื้อ Enterococci สายพันธุ์ดื้อยาแวนโคไมซิน และ *Streptococcus pneumoniae* (35) และพบว่าสามารถเสริมฤทธิ์ด้านจุลชีพเพื่อฆ่าเชื้อดื้อยาทั้งแวนโคไมซิน และซิโปรฟล็อกซาซิน (36) ล่าสุด

Shin และคณะ ในปี 2015 (32) รายงานว่าโนซิน สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทั้งชนิดแกรมบวก และแกรมลบ รวมทั้งไบโอฟิล์มในช่องปากได้โดยไม่เป็นพิษต่อเซลล์ในช่องปาก

มีรายงานของแลกทีซิน 3147 ที่สามารถยับยั้ง เชื้อก่อโรคที่ระบาดในโรงพยาบาล และดื้อยาหลาย ชนิดได้ไม่ว่าจะเป็น pneumococci, *S. aureus* สายพันธุ์ดื้อยาเมทิซิลลิน และเชื้อ Enterococci สายพันธุ์ดื้อยาแวนโคไมซินดื้อยามากกว่า 6 ชนิด (35) ออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อได้กว้าง วน ความเข้มข้นระดับนาโน-โมลาร์ สามารถยับยั้งการติดเชื้อทางระบบของ *S. aureus* ในหนูถีบจักร และไม่เป็นพิษต่อเซลล์ยูคาริโอตจึงเป็นแบคทีริโอซินอีกชนิดที่น่าจะมีศักยภาพ ในการประยุกต์ใช้ทางการแพทย์ต่อไป (37) และมีการศึกษาในสัตว์ทดลองพบว่าสามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* สายพันธุ์ดื้อยาหลายชนิดในหนู BALB/c ได้ ภายหลังที่ฉีดแลกทีซินทางใต้ผิวหนัง (subcutaneous) ในปริมาณรวมกันของ LtnA 50.85 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวหนู 1 กิโลกรัม และ Ltn B 43.8 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวหนู 1 กิโลกรัม (37)

บทบาทในทางทันตกรรม

มีรายงานถึงการนำสับทีโลซิน เอ มายับยั้งเชื้อ *Porphyromonas gingivalis* ได้โดยมีค่า MIC เท่ากับ 3.125–6.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (38) สำหรับการป้องกันโรคฟันผุนั้น มีวาทาซิน ที่ผลิตจากเชื้อ *S. mutans* VSM43 ซึ่งแยกได้จากช่องปากของอาสาสมัคร แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. mutans* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคฟันผุได้ ซึ่งมีการนำวิจัยหารูปแบบผลิตภัณฑ์ที่เหมาะสม อาทิ เป็นน้ำยาบ้วนปาก สเปรย์ ยาอมหรือรูปแบบที่เหมาะสมต่อการยับยั้ง การหมักน้ำตาลของเชื้อในช่องปากได้ (39)

บทบาทในการเป็นสารคุมกำเนิด

มีรายงานการนำแบคทีริโอซินมาใช้เป็นสาร ด้านเซลล์อสุจิ (spermicidal activity) เพื่อหวังผล ในการคุมกำเนิดได้อีกด้วย อาทิ สับทีลิน สับทีโลซิน และแลกทีซิน 3147 ที่มีรายงานว่าน่าจะมีศักยภาพ ในการเป็นสารคุมกำเนิดที่ปลอดภัยในสัตว์ทดลอง และมนุษย์ได้ (40) สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Bacteroides*, *Gardnerella vaginalis* และ *Mobiluncus* ที่ก่อให้เกิด bacterial vaginosis แล้ว ยังยับยั้งการเคลื่อนที่ และฆ่าเซลล์อสุจิซึ่งเป็นที่น่าสนใจ ในการนำไปใช้เป็นทั้งสารต้านจุลชีพ และต้านเซลล์ อสุจิได้ต่อไป

บทสรุป

ความรู้จากบทความฉบับนี้แสดงให้เห็นถึงการ วิจัยแลนทิไบโอติกซึ่งเป็นแบคทีริโอซิน คลาสที่ 1 ที่มีองค์ประกอบเป็นเพปไทด์สายนำ และเพปไทด์ สายหลักขณะอยู่ในเซลล์แบคทีเรีย แต่เมื่อผ่าน กระบวนการโดยเอนไซม์ต่าง ๆ แล้วเพปไทด์สายนำ จะถูกตัดออกจากเพปไทด์สายหลัก ก่อนที่เพปไทด์ สายหลักจะสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลชีพเมื่อ เพปไทด์ออกมานอกเซลล์ ขณะเดียวกันเซลล์ดังกล่าว ยังปลดปล่อยโปรตีนที่ทำหน้าที่เป็นภูมิคุ้มกัน ทำให้ไม่ถูกทำลายด้วยฤทธิ์ของเพปไทด์สายหลักได้ จากฤทธิ์ต้านจุลชีพ และฤทธิ์ทางชีวภาพอื่น ๆ ที่กว้าง ของแลนทิไบโอติกชนิดต่าง ๆ นักวิทยาศาสตร์จึงนำ มาประยุกต์ใช้อย่างแพร่หลาย หนึ่งในนั้นคือการวิจัย และพัฒนาแลนทิไบโอติกเพื่อประยุกต์ใช้ในเชิงการ แพทย์ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. Cleveland J, Montville TJ, Nes IF, Chikindas ML. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int J Food Microbiol.* 2001;71:1-20.
2. Deegan LH, Cotter PD, Hill C, Ross P. Bacteriocin: biological tools for biopreservation and shelf-life extension. *Inter Dairy J.* 2006;16:1058-71.
3. Klaenhammer TR. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Rev.* 1993;12:39-85.
4. Oscáriz JC, Pisabarro AG. Classification and mode of action of membrane-active bacteriocins produced by gram-positive bacteria. *Int Microbiol.* 2001;4:13-9.
5. Chen H, Hoover DG. Bacteriocins and their food applications. *Comp Rev Food Sci Food Saf.* 2003;2:82-100.
6. Nes IF, Yoon SS, Diep DB. Ribosomally synthesized antimicrobial peptides (bacteriocins) in lactic acid bacteria: a review. *Food Sci Biotechnol.* 2007;16:675-690.
7. McAuliffe O, Ross RP, Hill C. Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. *FEMS Microbiol Rev.* 2001;25:285-308.
8. Montalbán-López M, Sánchez-Hidalgo M, Cebrián R, Maqueda M. Discovering the bacterial circular proteins: bacteriocins, cyanobactins, and pilins. *J Biol Chem.* 2012;287:27007-13.
9. Cox CL, Doroghazi JR, Mitchell DA. The genomic landscape of ribosomal peptides containing thiazole and oxazole heterocycles. *BMC Genomics* 2015;16:778. doi: 10.1186/s12864-015-2008-0.
10. Kawulka K, Sprules T, McKay RT, Mercier P, Diaper CM, Zuber P, et al. Structure of subtilisin A, an antimicrobial peptide from *Bacillus subtilis* with unusual posttranslational modifications linking cysteine sulfurs to alpha-carbons of phenylalanine and threonine. *J Am Chem Soc.* 2003;125:4726-7.
11. Stepper J, Shastri S, Loo TS, Preston JC, Novak P, Man P, et al. Cysteine S-glycosylation, a new post-translational modification found in glycopeptide bacteriocins. *FEBS Lett.* 2011;585:645-50.
12. Hegemann JD, Zimmermann M, Xie X, Marahiel MA. Lasso peptides: an intriguing class of bacterial natural products. *Acc Chem Res.* 2015;48:1909-19.
13. Cotter PD, Hill C, Ross RP. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat Rev Microbiol.* 2005;3:777-88.
14. de Vos WM, Kuipers OP, van der Meer JR, Siezen RJ. Maturation pathway of nisin and other lantibiotics: posttranslationally modified antimicrobial peptides exported by gram positive bacteria. *Mol Microbiol.* 1995;17:427-37.
15. Knerr PJ, van der Donk WA. Discovery, biosynthesis, and engineering of lantipeptides. *Annu Rev Biochem.* 2012;81:479-505.
16. Bahey-El-Din M, Gahan CG, Griffin BT. *Lactococcus lactis* as a cell factory for delivery of therapeutics proteins. *Curr Gene Ther.* 2010; 10:34-45.
17. Willey JM, van der Donk WA. Lantibiotics: peptides of diverse structure and function. *Annu Rev Microbiol.* 2007;61:477-501.
18. Islam MR, Shioya K, Nagao J, Nishie M, Jikuya H, Zendo T, et al. Evaluation of essential and variable residues of nukacin ISK-1 by NNK scanning. *Mol Microbiol.* 2009;72:1438-47.
19. Stevens KA, Sheldon BW, Klapes NA, Klaenhammer TR. Nisin treatment for inactivation of *Salmonella* species and other gram-negative bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 1991; 57:3613-5.
20. Oren Z, Shai Y. Mode of action of linear amphipathic alpha-helical antimicrobial peptides. *Biopolymers.* 1998;47:451-63.
21. Wiedemann I, Böttiger T, Bonelli RR, Wiese A, Hagge SO, Gutschmann T, et al. The mode of action of the lantibiotic lactacin 3147-a complex mechanism involving specific interaction

- of two peptides and the cell wall precursor lipid II. *Mol Microbiol.* 2006;61:285-96.
22. Yoneyama F, Ohno K, Imura Y, Li M, Zendo T, Nakayama J, et al. Lactacin Q-mediated selective toxicity depending on physicochemical features of membrane components. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55:2446-50.
23. Sass P, Jansen A, Szekat C, Sass V, Sahl H-G, Bierbaum G. The lantibiotic mersacidin is a strong inducer of the cell wall stress response of *Staphylococcus aureus*. *BMC Microbiol.* 2008;8:186 doi:10.1186/1471-2180-8-186.
24. van Belkum MJ, Kok J, Venema G, Holo H, Nes IF, Konings WN, Abee T. The bacteriocin lactococcin A specifically increases permeability of lactococcal cytoplasmic membranes in a voltage-independent, protein-mediated manner. *J Bacteriol.* 1991;173:7984-91.
25. Rodriguez JM, Dodd HM. Genetic determinants for the biosynthesis of nisin, a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis*. *Microbiol Sem.* 1996;12:61-74.
26. Hoffmann A, Schneider T, Pag U, Sahl HG. Localization and functional analysis of Pepl, the immunity peptide of Pep5-producing *Staphylococcus epidermidis* strain 5. *Appl Environ Microbiol.* 2004;70:3263-71.
27. Kleerebezem M, Bongers R, Rutten G, de Vos WM, Kuipers OP. Autoregulation of subtilin biosynthesis in *Bacillus subtilis*: the role of the spa-box in subtilin-responsive promoters. *Peptides.* 2004;25:1415-24.
28. Hacker C, Christ NA, Duchardt-Fermer E, Korn S, Gobi C, Berninger L, et al. The solution structure of the lantibiotic immunity protein NisI and its interactions with nisin. *J Biol Chem.* 2015;290:28869-86.
29. Peschel A, Götz F. Analysis of the *Staphylococcus epidermidis* genes *epiF*, *-E*, and *-G* involved in epidermin immunity. *J Bacteriol.* 1996;178:531-6.
30. Bierbaum G, Sahl HG. Lantibiotics: mode of action, biosynthesis and bioengineering. *Curr Pharm Biotechnol.* 2009;10:2-18.
31. Cotter PD, Ross RP, Hill C. Bacteriocins-a viable alternative to antibiotics? *Nature Rev Microbiol.* 2013;11:95-105.
32. Shin JM, Ateia I, Paulus JR, Liu H, Fenno JC, Rickard AH, Kapila YL. Antimicrobial nisin acts against saliva derived multi-species biofilms without cytotoxicity to human oral cells. *Front Microbiol.* 2015;6:617. doi: 10.3389/fmicb.2015.00617
33. Mah TFC, O'Toole GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol.* 2001;9:34-9.
34. Balciunas EM, Martinez FAC, Todorov SD, de Melo Franco BDG, Converti A, de Souza Oliveira RP. Novel biotechnological applications of bacteriocins: a review. *Food Control.* 2013; 32:134-42.
35. Piper C, Draper LA, Cotter PD, Ross RP, Hill C. A comparison of the activities of lactacin 3147 and nisin against drug-resistant *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus* species. *J Antimicrob Chemother.* 2009;64:546-51.
36. Dosler S, Gerciker AA. In vitro activities of nisin alone or in combination with vancomycin and ciprofloxacin against methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains. *Chemotherapy.* 2011;57:511-6.
37. Piper C, Casey PG, Hill C, Cotter PD, Ross RP. The lantibiotic lactacin 3147 prevents systemic spread of *Staphylococcus aureus* in a murine infection model. *Int J Microbiol.* 2012; 2012:806230.doi: 10.1155/2012/806230.
38. Shelburne CE, An FY, Dholpe V, Ramamoorthy A, Lopatin DE, Lantz MS. The spectrum of antimicrobial activity of the bacteriocin subtilisin A. *J Antimicrob Chemother.* 2007;59: 297-300.

39. Ahmad S, Rasool SK. Isolation and biochemical characterization of mutacin VSM 43 isolated from human oral *Streptococcus mutans* VSM 43. Pak J Pharm Sci. 2003;16:43-50.
40. Sutyak KE, Wirawan RE, Aroutcheva AA, Chikindas ML. Isolation of the *Bacillus subtilis* antimicrobial peptide subtilisin from the dairy product-derived *Bacillus amyloliquefaciens*. J Appl Microbiol. 2008;104:1067-74.

Lantibiotics : Synthesis and Antimicrobial activity

Siriwoot Sookkhee and Choompone Sakonwasun

Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chiang Mai university

Lantibiotic is the antimicrobial peptides that most of them were produced from a member of lactic acid bacteria. It is classified into class I of bacteriocin. The important peptides are nisin, lactacin 3147, and subtilin. Its propeptide consists of the lantionine or methyl-lantionine structures which formed during the post-translational modification. It is broad spectrum against the various groups of bacteria. Mechanism of action depends on its type and peptide property. Currently, some lantibiotics possess the potential to apply for eradicating the antibiotic-resistant pathogens that may be reduced the drug resistant problem. The present article proposes about the synthesis step and antimicrobial activity of lantibiotic and includes about the potentials for further application in the medical aspects. **Chiang Mai Medical Journal 2017;56(4):231-41.**

Keywords: probiotic, lactic acid bacteria, lantibiotics, antimicrobial, medical applications