

การโคลนยีน *arsenate reductase* และ *phytochelatin synthase* ที่ตอบสนองต่อสารหนูในข้าวอินดิคาพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105

Molecular cloning of *arsenate reductase* and *phytochelatin synthase* genes related to arsenic response in *Oryza sativa* L. ssp. *indica* cv. Khao Dawk Mali 105

ปาวรัตน์ ปฏิพิพัฒน์¹ กฤษณา พันิจ² ภาวรรณ วงศ์คำไพ² พัฒนา ศรีฟ้า ฮุนเนอร์^{1,2*}

Pawonrat Patipipat¹, Kisana Bhinija², Bhawat Wongkhamprai², Pattana Srifah Hunhne^{1,2*}

¹ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900 ประเทศไทย

²ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ กรุงเทพฯ 10210 ประเทศไทย

¹Department of Genetics, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand

²Laboratory of Biotechnology, Chulabhorn Research Institute, Bangkok 10210, Thailand

*Corresponding author: fscipns@ku.ac.th

บทคัดย่อ

สารหนู (arsenic, As) ที่สะสมในพืชเป็นปริมาณสูงจะส่งผลให้เกิดการยับยั้งการเจริญเติบโตของพืชได้ ดังนั้นเมื่อพืชได้รับสารหนูเข้าทางเซลล์ราก จึงเกิดกลไกการลดความเป็นพิษของสารหนูที่เข้าสู่เซลล์พืชด้วยเอนไซม์หลัก คือ *arsenate reductase* (AR) และ *phytochelatin synthase* (PCS) งานวิจัยนี้ได้โคลนยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกดังกล่าวจากรากของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่ได้รับสารหนู โดยพบว่ายีน *arsenate reductase* ที่โคลนได้ประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์ 414 คู่เบส กำหนดการสร้างสายโพลีเปปไทด์ 137 เรสซิดิวส์ ที่ประกอบด้วยลำดับกรดอะมิโนส่วนอนุรักษ์ HisCys(X)₅Arg ซึ่งมีหน้าที่สำคัญต่อปฏิกิริยารีดักเทส และพบว่ามี ความคล้ายกับ *arsenate reductase* ที่ได้จากข้าวแอฟริกา (*Oryza glaberrima* Steud.) นอกจากนี้ยังได้โคลนบางส่วนของยีน *phytochelatin synthase* ในบริเวณส่วนปลาย 3' ของยีน ขนาด 1,498 คู่เบส ประกอบด้วยยีนขนาด 873 คู่เบส กำหนดการสร้างสายโพลีเปปไทด์ที่มีความยาวกรดอะมิโน 290 เรสซิดิวส์ ลำดับกรดอะมิโนความคล้ายกับ *phytochelatin synthase* ของข้าวสาลี (*Triticum aestivum* L.) ทั้งยังพบกรดอะมิโนส่วนอนุรักษ์ CyCys(X)₃Cys(X)₂Cys บริเวณปลาย C-terminus ซึ่งมีหน้าที่สำคัญในการจับกับโลหะหนักและสารหนู

ABSTRACT

Accumulation of arsenic (As) in plants can severely inhibit plant growth. Once the arsenic is taken up by roots, arsenic detoxification enzymes such as *arsenate reductase* (AR) and *phytochelatin synthase* (PCS) are up-regulated in response to arsenic accumulation. In this study, the two-detoxification enzymes were cloned from roots of arsenic-treated *Oryza sativa* L. ssp. *indica*, cv. Khao Dawk Mali 105 (Jasmine rice). The results showed that the AR gene consists of 414 bp encoding a polypeptide with 137 amino acids long. This encoded amino acid sequence contains the consensus motif HisCys(X)₅Arg that is essential for reductase activity and is similar to the *arsenate reductase* polypeptide from African rice (*Oryza glaberrima* Steud.). Moreover, the partial *phytochelatin synthase* gene at 3' end, 1,498 bp containing 873 coding sequence, was successfully cloned. The obtained *phytochelatin synthase* gene encoding for a 290 amino acid polypeptide was highly related to *phytochelatin synthase* from *Triticum aestivum* L. The deduced

amino acid sequence contained consensus motif CysCys(X)₃Cys(X)₂Cys at C-terminal which serves as a sensor for heavy metal ions and arsenic.

คำสำคัญ: ข้าว; พันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105; สารหนู; อาร์เซเนต รีดักเทส; ไฟโทคีเลติน ซินเทส

Keywords: *Oryza sativa*; Khao Dawk Mali 105; arsenic; arsenate reductase; phytochelatin synthase

บทนำ

ข้าวเป็นพืชเศรษฐกิจที่มีความสำคัญของประเทศไทย ทั้งนี้เพราะการเกษตรส่วนใหญ่ของประเทศปลูกข้าวเป็นพืชหลัก อย่างไรก็ตามปัจจุบันมีรายงานพบการปนเปื้อนของสารหนูในเมล็ดข้าว (Meharg *et al.*, 2008) ซึ่งนอกจากจะส่งผลกระทบต่อคุณภาพของข้าวแล้ว ยังส่งผลกระทบต่อสุขภาพของผู้บริโภค โดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศที่บริโภคข้าวเป็นอาหารหลัก การปนเปื้อนสารหนูของข้าวมาจากดินที่ปลูก ซึ่งปลูกในที่ชุ่มน้ำและน้ำที่ปนเปื้อนสารหนู สารหนูจะถูกดูดซึมทางรากส่งผ่านท่อลำเลียงน้ำไปยังยอด และสะสมในเมล็ดข้าวในที่สุด (Zhao, 2008) เนื่องจากสารหนูไม่ใช่ธาตุอาหารที่จำเป็นต่อพืช ดังนั้นหากพืชได้รับสารหนูและเกิดการสะสมในพืชเป็นปริมาณสูง อาจส่งผลให้เกิดการยับยั้งการเจริญเติบโตของพืชได้ นอกจากนี้สารหนูที่สะสมในเมล็ดข้าวยังจัดเป็นสารพิษที่มีผลเสียต่อสุขภาพของมนุษย์อีกด้วย (Meharg, 2004)

สารหนูที่พบในเซลล์สิ่งมีชีวิตจัดเป็นอนินทรีย์สารที่อยู่ใน 2 รูปแบบ คือ arsenate (AsV) และ arsenite (AsIII) ในเซลล์พืชจะเกิดปฏิกิริยารีดักชันเปลี่ยนสารหนูในรูป arsenate (AsV) ให้เป็น arsenite (AsIII) โดยเอนไซม์ arsenate reductase (AR) (Ghosh *et al.*, 1999) จากนั้นสารหนูในรูป arsenite บางส่วนจะถูกส่งขึ้นไปยังยอดแล้วสะสมในเมล็ด บางส่วนจะเข้าจับกับโปรตีน phytochelatin (PCs) ซึ่งถูกสร้างมาจากเอนไซม์ phytochelatin synthase (PCS) โดยใช้ glutathione (GSH) เป็นสารตั้งต้น โดย arsenite จะเข้าจับกับโปรตีน phytochelatin เป็นองค์ประกอบรวมและเข้าไปสะสมในแวคิวโอลเพื่อลดความเป็นพิษในเซลล์ (Waqar *et al.*, 2009)

ในสิ่งมีชีวิตหลายๆ ชนิด ปฏิกิริยารีดักชันโดยเอนไซม์ arsenate reductase เป็นขั้นตอนแรกใน

ขบวนการเมตาบอลิซึมของสารหนูที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ และนับว่าเป็นขั้นตอนสำคัญ เพราะมีผลต่อขบวนการลดความเป็นพิษของสารหนู และการกำจัดสารหนูซึ่งเป็นขบวนการที่จะเกิดขึ้นถัดไป (Ghosh *et al.*, 1999; Radabaugh and Aposhian, 2000; Mukhopadhyay and Rosen, 2002)

พิษของสารหนูหรือโลหะหนักที่มีต่อพืชเกิดจากสาเหตุหลายประการ เช่น โลหะหนักเข้าจับกับโปรตีนบริเวณหมู่ thioyl-, carboxyl- หรือ histidyl- ทำให้มีผลต่อกิจกรรมและหน้าที่ของโปรตีนต่างๆ ภายในเซลล์ หรืออาจทำให้เกิด reactive oxygen species (ROS) ซึ่งเป็นพิษต่อเซลล์ ดังนั้นพืชจึงมีการป้องกันตนเองโดยการกระตุ้นการทำงานของระบบขจัดอนุมูลอิสระ (Sharma and Dietz, 2008) รวมถึงการสร้าง phytochelatin และ glutathione ซึ่งใช้เป็นสารตั้งต้น (Cobbett and Goldsbrough, 2002) นอกจาก glutathione จะถูกใช้เป็นสารตั้งต้นแล้วยังมีบทบาทร่วมในการขจัดอนุมูลอิสระอีกด้วย (May *et al.*, 1998) มีรายงานว่า การเพิ่มการแสดงออกของยีน *phytochelatin synthase* และการสังเคราะห์ glutathione ในพืชส่งผลให้พืชสามารถต้านทานต่อแคดเมียมได้ดีขึ้น แต่อย่างไรก็ตามหากมากเกินไปก็อาจทำให้เกิด oxidative stress ได้ (Nocito *et al.*, 2006)

เนื่องจากยังไม่มีการศึกษาชนิดของยีนที่เกี่ยวข้องกับขบวนการเมตาบอลิซึมของสารหนูในข้าวสายพันธุ์ไทยที่ปลูกเป็นการค้า ดังนั้นการศึกษานี้จึงมุ่งเน้นการโคลนและวิเคราะห์ยีน ที่เกี่ยวข้องกับการลดความเป็นพิษของสารหนูในเซลล์รากข้าวพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 จำนวน 2 ยีน คือ *arsenate reductase (AR)* และ *phytochelatin synthase (PCS)* ซึ่งข้อมูลที่ได้นี้จะประโยชน์ต่อการปรับปรุงพันธุ์ข้าวที่สามารถต้านทานต่อสารหนูได้ในอนาคต

อุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียมตัวอย่างพืช

นำเมล็ดข้าวพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 (*Oryza sativa* L. spp. *indica*, cv. Khao Dawk Mali 105) จำนวน 100 เมล็ด มาปลูกในภาชนะปลูกขนาด 17x30x15 เซนติเมตร ที่เติมน้ำ 500 มิลลิลิตร ทั้งหมด 6 ใบ โดยแบ่งเป็น 2 ชุดการทดลอง ชุดละ 3 ใบ (3 ซ้ำ) เป็นเวลา 1 สัปดาห์ จากนั้น

เปลี่ยนน้ำในภาชนะชุดที่ 1 เป็นน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร (ชุดควบคุม) และชุดที่ 2 เป็นสารหนูที่ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 500 มิลลิลิตร เป็นเวลาอีก 3 สัปดาห์ โดยตรวจสอบปริมาตรน้ำในภาชนะปลูกทุกๆ 24 ชั่วโมง ให้มีปริมาตร 500 มิลลิลิตรอยู่เสมอ บันทึกการออก การเจริญเติบโต และการเปลี่ยนแปลงทุกสัปดาห์จนครบ 4 สัปดาห์ แล้วแยกเอาบริเวณรากมาสกัดอาร์เอ็นเอ

การแยกอาร์เอ็นเอรวม

สกัดอาร์เอ็นเอรวมด้วย Trizol reagent (Gibco BRL, USA) จากรากของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่ได้รับสารหนูโดยใช้วิธีการตามเอกสารแนะนำของบริษัท

การสังเคราะห์ยีนจากอาร์เอ็นเอรวมด้วยวิธี RT-PCR

นำอาร์เอ็นเอรวมที่แยกได้จากรากข้าวปริมาณ 5 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร มาสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายแรก โดยใช้ Ready-To-Go You-Prime first strand beads (GE Healthcare Biosciences, USA) นำดีเอ็นเอสายแรก มาเป็นต้นแบบในการสังเคราะห์ยีนเป้าหมายด้วยเทคนิค พีซีอาร์ โดยใช้เอนไซม์ i-taq DNA Polymerase (Intron Biotechnology, Korea) ไพร์เมอร์ที่ใช้ในการสังเคราะห์ *arsenate reductase* คือ ไพร์เมอร์ forward AR1_F (5'ATGGCGCGGAGCGTGTCTGAC3') และไพร์เมอร์ reverse ARend_R (5'TTACAACCTCAGGTTCTTCAG GTGA3') ที่จำเพาะต่อยีน และสังเคราะห์ *phytochelatin synthase* ทางด้านปลาย 3' ด้วยไพร์เมอร์ forward PCS679_F (5'GGGTTCATGCTTATCTCAAG3') และ ไพร์เมอร์ reverse ที่มี oligodT 233RACE(T) (5'GACTC GAGTCGACATCGTTTTTTTTTTTTTTTTTTT3') ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ดังนี้ รอบที่ 1 ที่ 94 องศาเซลเซียส 5 นาที รอบที่ 2-30 ที่ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 60 องศาเซลเซียส 30 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส 30 วินาที และรอบสุดท้าย ที่ 72 องศาเซลเซียส 5 นาที

การโคลนยีน

นำชิ้นดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้เชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pGEM[®]-T (Promega Corporation, USA) แล้วนำไปปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง จากนั้น

ถ่ายพลาสมิดสายผสมเข้าสู่ *Escherichia coli* สายพันธุ์ XL-1 Blue โดยใช้เทคนิค heat-shock transformation (Sambrook *et al.*, 2001) คัดเลือกโคโลนีจาก β -galactosidase assay และตรวจสอบด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้ไพร์เมอร์ จำเพาะข้างต้น สำหรับตรวจสอบยีน *arsenate reductase* และ *phytochelatin synthase* จากนั้นแยกพลาสมิดจาก โคโลนีสีขาวที่มียีนสายผสมด้วยเทคนิค alkaline lysis ตามวิธีของ Sambrook *et al.* (2001) แล้วหาลำดับเบส ของยีนที่โคลนได้โดยส่งบริษัท Macrogen (Korea)

การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่โคลนได้ มาแปลรหัสเป็นกรดอะมิโน ด้วยโปรแกรม ORF finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/>) จากนั้นสืบค้นลำดับนิวคลีโอไทด์ ที่คล้ายกันที่มีรายงานอยู่ในฐานข้อมูล โดยใช้โปรแกรม BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) เปรียบเทียบ ความเหมือนและความแตกต่างของลำดับกรดอะมิโนที่ได้ กับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนที่มีรายงานในฐานข้อมูล ด้วยโปรแกรม ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) และสร้าง phylogenetic tree ด้วย โปรแกรม MEGA 4.0 (<http://www.megasoftware.net>) (Tamura *et al.*, 2007)

ผลการทดลองและวิจารณ์

การเจริญเติบโตของพืช

ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่ปลูกในน้ำเป็นเวลานาน 1 สัปดาห์ มีการเจริญเป็นปกติ เมื่อย้ายข้าวมา ปลูกในน้ำที่มีสารหนูความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ นาน 2 และ 3 สัปดาห์ มีอัตราการรอดชีวิตร้อยละ 63 และ 45 ตามลำดับ โดยต้นข้าวมีอาการต้นสีเหลือง ต้นชะงักการ เจริญเติบโตและรากสั้น ในสัปดาห์ที่สี่นับตั้งแต่การเพาะ เมล็ดข้าว

การสังเคราะห์ยีนด้วยวิธี RT-PCR

จากการสังเคราะห์ยีน *arsenate reductase* ด้วยวิธีพีซีอาร์พบว่าได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 414 คู่เบส เมื่อสังเคราะห์ยีน *phytochelatin synthase* ทางด้าน ปลาย 3' พบว่าได้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 1,498 คู่เบส

นำผลผลิตพีชีอาร์ที่อยู่ในพลาสมิดสายผสมถ่ายเข้าสู่ *E. coli* เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิคพีชีอาร์พบโคลนีสี่ขาวที่ผ่านการคัดเลือกจำนวน 2 และ 4 โคลน ที่ได้รับพลาสมิดสายผสมที่มียีน *arsenate reductase* และ *phytochelatin synthase* ตามลำดับ นำพลาสมิดที่ได้ไปหาลำดับเบส

การวิเคราะห์ยีน *arsenate reductase*

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *arsenate reductase* ที่ได้จากเซลล์รากของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 มีขนาด 414 คู่เบส (accession no. KJ200296) เมื่อนำมาแปลรหัส เป็นการถอดมิโนด้วยโปรแกรม ORF finder สามารถแปลรหัสได้ 1 open reading frame (ORF) ที่กำหนดการสร้างสายโพลีเปปไทด์ขนาดความยาว 137 เรสซิดิวส์

เมื่อนำข้อมูลการจัดเรียงตัวของกรดอะมิโนที่ได้มาเปรียบเทียบกับโปรตีนที่มีรายงานอยู่ในฐานข้อมูลโดยใช้โปรแกรม BLASTP พบว่ามีความคล้ายคลึงกับโปรตีนที่พบในพืชหลายชนิด โดยเฉพาะในกลุ่มธัญพืช (Table 1) ได้แก่ ข้าวแอฟริกา (*Oryza glaberrima* Steud.), ข้าวฟ่าง (*Sorghum bicolor* (L.) Moench.), ข้าวโพด (*Zea mays* L.) และ ข้าวบาร์เลย์ (*Hordeum vulgare* L.) เป็นต้น คิดเป็นร้อยละ 99, 85, 83, และ 83 ตามลำดับ

จากการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนกับโปรตีนที่มีรายงานอยู่ในฐานข้อมูล พบว่ามีความคล้ายกับพืช

ชนิดต่างๆ คิดเป็นร้อยละ 48–99 (Table 1) ประกอบด้วยพืชใบเลี้ยงเดี่ยว 7 ชนิด ได้แก่ ข้าวแอฟริกา, ข้าวฟ่าง, ข้าวโพด, ข้าวบาร์เลย์, ข้าวฟ่างหางกระรอก (*Setaria italic* (L.) P.Beauv.), purple false brome (*Brachypodium distachyon* (L.) P.Beauv.) และ velvet grass (*Holcus lanatus* L.) พืชใบเลี้ยงคู่อีก 2 ชนิด ได้แก่ มันต่อเผือก (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) และอะราบิดอพิซิส (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) รวมทั้งเฟิร์น ได้แก่ กูดหมาก (*Pteris vittata* L.) และยังพบลำดับกรดอะมิโนอนุรักษ์เป็นโมทิฟ (motif) คือ HisCys(X)₆Arg ในพืชทุกชนิด (Figure 1) โดยในข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 มีลำดับกรดอะมิโนเป็น His⁷⁰Cys⁷¹AlaLeuSerLysValArg⁷⁷

เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของโปรตีนด้วย phylogenetic tree โดยใช้โปรแกรม MEGA 4.0 (Figure 2) พบว่าโปรตีน *arsenate reductase* ในข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับข้าวแอฟริกา และมีความใกล้ชิดกับโปรตีน *arsenate reductase* ที่พบในข้าวฟ่าง, ข้าวโพด, ข้าวฟ่างหางกระรอก, ข้าวบาร์เลย์ และ purple false brome ซึ่งจัดเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวเช่นเดียวกัน ในขณะที่มีความแตกต่างจากพืชใบเลี้ยงคู่ ได้แก่ มันต่อเผือกและอะราบิดอพิซิส รวมทั้ง *arsenate reductase* จากกูดหมากซึ่งจัดเป็นเฟิร์น จึงถูกจัดออกจากกลุ่มของพืชใบเลี้ยงเดี่ยวและใบเลี้ยงคู่

Table 1 Comparison of amino acid sequence similarity between Jasmine rice *arsenate reductase* and other *reductase* genes found in GenBank.

Accession No.	Plant species	Common name	Amino acids	%Identity
KJ200296	<i>Oryza sativa</i> L. spp. <i>indica</i> , cv. Khao Dawk Mali 105	Jasmine rice 105	137	100
I1QVM3	<i>Oryza glaberrima</i> Steud.	African rice	137	99
C5WTH4	<i>Sorghum bicolor</i> (L.) Moench.	Sorghum	131	85
B6TQK1	<i>Zea mays</i> L.	Corn	131	83
M0WIP5	<i>Hordeum vulgare</i> L.	Barley	130	83
XP_004983768	<i>Setaria italic</i> (L.) P.Beauv.	Foxtail millet	131	83
I115V8	<i>Brachypodium distachyon</i> (L.) P.Beauv.	Purple false brome	131	82
AAU11500	<i>Holcus lanatus</i> L.	Velvet grass	131	71
ADK38620	<i>Ipomoea batatas</i> (L.) Lam.	Sweet potato	139	57
ABM05620	<i>Pteris vittata</i> L.	Chinese brake fern	130	48
NP_568119	<i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heynh.	Mousear cress	130	59

Ipomoea_batata	MTRS--TTYITASQLLSLKR-RPNIAIVDVRDDERSCDGHIAGSLHFASD 47
Arabidopsis_thaliana	MARS--ISYITSTQLPLHR-RPNIAIIDVRDEERNYDGHIAAGSLHYASG 47
oryza_sativa	MARS--VSYSVSAAKLLAMARGNPRVAIIDVRDEERSYQAHIGRSHHFSSR 48
Oryza_glaberrima	MARS--VSYSVSAAKLLAMARGNPRVAIIDVRDEERSYQAHIGGSHHFSSR 48
Sorghum_bicolor	MARS--VSYSVSAAKLVSMARGNPRVAIIDVRDEERSYQAHIAAGSHHFASG 48
Zea_mays	MARS--VSYSVSAAKLVSMARGNPRVAIIDVRDEERSYQAHIAAGSHHFASG 48
Setaria_italica	MARS--VSYSVSAAKLVSMARGNPRVAIIDVRDEERSYQAHIAAGSHHFASG 48
Hordeum_vulgare	MARS--VSYSVSAAKLVSMARGN-RVAVIDVRDEERSYQAHIAAGSHHFASG 47
Brachypodium_distachyon	MARS--VSCVSAAKLVSMTRGNRLAVIDVRDEERSYQAHIAAGSHHFASG 48
Holcus_lanatus	MARKG-VSYVTAAELVSLVR-DPRVAIIDVRDEERICDAHIAAGSHHYASD 48
Pteris_vittata	MASLHTLSYITASELQRLQP-NSKLAIIDVRDEERSYDGHIAAGSHWFASD 49
	*: : : : : * : : : : * : : : : * : : : : *
Ipomoea_batata	TFLDKLPSLVQSVKGKDTLVFHCALSQVRGPKCARRLAEYLSDEMDDAG 97
Arabidopsis_thaliana	SFDDKISHLVQNVKDKDTLVFHCALSQVRGPTCARRLVNYL-DEKKEDTG 96
oryza_sativa	SFAARLPELARATGDKDTLVFHCALSKVRGPSCAKMFSDDL-SETKEESG 97
Oryza_glaberrima	SFAARLPELARATGDKDTLVFHCALSKVRGPSCAKMFSDDL-SETKEESG 97
Sorghum_bicolor	SFEARMPELARAASGKDTLVFHCALSQVRGPTCARMFSDYL-SETKEDSG 97
Zea_mays	SFEARMPELVRAASGKDTLVFHCALSQVRGPTCARMFSDYL-SETKEDSG 97
Setaria_italica	SFAARMPELVQAASGKDTLVFHCALSQVRGPTCARMFSDYL-SETKEDSE 97
Hordeum_vulgare	SFAARMPELVRAATSGKDTLVFHCALSQVRGPSCARMFSDYL-SESKEDSG 96
Brachypodium_distachyon	SFAARLPELVRAATSGKDTLVFHCALSQVRGPSCARMFSDYL-SESKEDSG 97
Holcus_lanatus	GFAERLPEIAEATRAKETLVFHCALSQVRGPTCARMFSDYL-SEAKEDSG 97
Pteris_vittata	TFVEELPALVGKLEGQEAUVFHCALSKVRGPSCAKKFVDHL-ATLASYN 98
	* : : : : : : : : : : * : : : : * : : : : *
	HC.....R
Ipomoea_batata	IKNIMVLERGYNWEASGRPVCRCTDVFCKDNSEHGQSQNS 139
Arabidopsis_thaliana	IKNIMILERGFGNWEASGKPVCRCAEVPCKGDCA----- 130
oryza_sativa	TKNIMVLERGFGNWEISGQPVCRCTDAPCKGTCSPEEPEL-- 137
Oryza_glaberrima	TKNIMVLERGFGNWEISGQPVCRCTDAPCKGTCSPEEPEL-- 137
Sorghum_bicolor	IKNIMVLELGFNGWEGSQPVCRCTDAPCKGTCC----- 131
Zea_mays	IKNIMVLERGFGNWEVSGQPVCSCTDAHCKGTCS----- 131
Setaria_italica	IKNIMVLELGFNGWEGSQPVCRCTDAPCKGTCS----- 131
Hordeum_vulgare	IKNIMVLERGYNWEISGQPVCHCKDAPCKGTCS----- 130
Brachypodium_distachyon	IKNIMVLERGFGNWEISGQVHCNCKDAPCKGTCS----- 131
Holcus_lanatus	VKSITILERGFGNWEISGRPVCRCKDAPCKGVCS----- 131
Pteris_vittata	APQVYVLERGFGNWEASGHPVCNCAQPHCKG-C----- 130
	: : * : * : * : * : * : * : * : *

Figure 1 Multiple amino acid sequence alignment of arsenate reductases. The consensus HC(X)₅R motif was identified (boxed region). Identical residues are represented by “*”, conserved substitution residues by “:”, semi-conserved substitution residues by “.”.

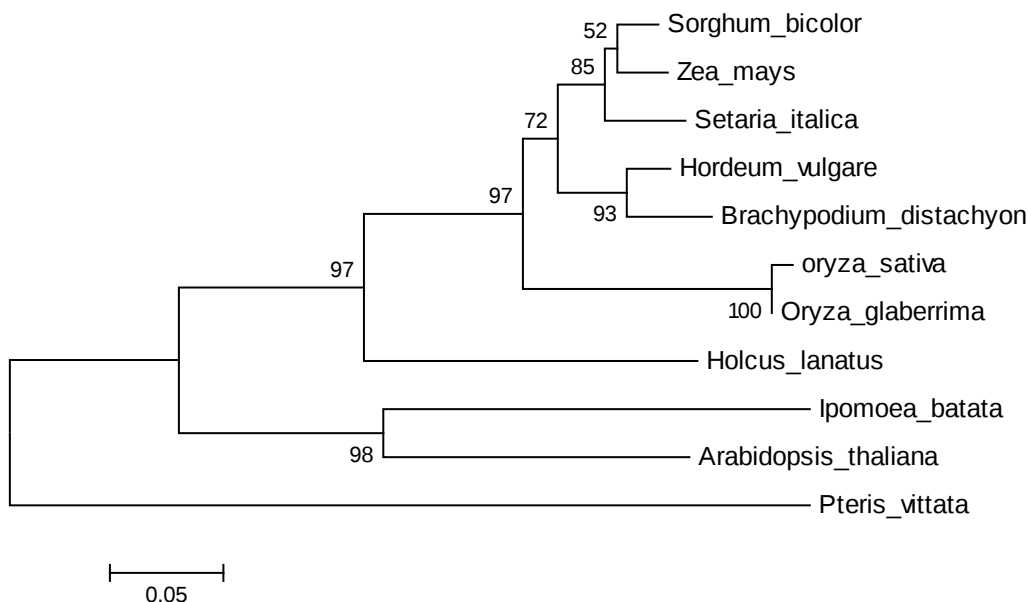


Figure 2 Phylogenetic tree of arsenate reductase amino acid sequences from eleven plant species. The tree was constructed by neighbor-joining method and the Poisson correction using MEGA 4.0 with a bootstrap number of 1000.

การวิเคราะห์ยีน *phytochelatin synthase*

จากการโคลนดีเอ็นเอผลผลิตพีซีอาร์ทางด้านปลาย 3' พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่โคลนได้ประกอบด้วย 1,498 คู่เบส (accession no. KJ200297) ซึ่งประกอบด้วย ส่วนที่เป็นยีน 873 คู่เบส และกำหนดการแปลรหัสเป็น กรดอะมิโนขนาด 290 เรสซิดิวส์ เมื่อนำลำดับกรดอะมิโน ของยีนที่โคลนได้ไปเปรียบเทียบกับโปรตีนที่มีรายงานไว้ในฐานข้อมูลโดยใช้โปรแกรม BLASTX พบว่ายีนที่โคลนได้ เหมือนกับ hypo-thetical protein (accession no. EEC79817) ที่แยกจากข้าว *Oryza sativa* คิดเป็นร้อยละ 99 และมีลำดับ กรดอะมิโนคล้ายกับโปรตีน phytochelatin synthase ในพืชหลายชนิดที่ระดับที่แตกต่างกัน (Table 2)

จากการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีนที่ โคลนได้กับโปรตีน phytochelatin synthase ที่มีรายงานไว้ในฐานข้อมูล พบว่าลำดับกรดอะมิโนมีความคล้ายคลึง กันคิดเป็นร้อยละ 45–71 (Table 2) โดยลำดับกรดอะมิโน ที่พบในข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 มีความคล้ายคลึงกับ phytochelatin synthase ที่พบในข้าวสาลี (*Triticum aestivum* L.) มากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 71 และยังพบ

ลำดับกรดอะมิโนอนุรักษ์ CysCysXXXCysXXCys (Figure 3) ในพืชหลายชนิด ได้แก่ข้าวสาลี, บัวหลวง (*Nelumbo nucifera* Gaertn.), ถั่วเหลือง (*Glycine max* (L.) Merr.), birch-leaved pear (*Pyrus betulifolia* Bunge.), อะรา บิดอฟซิส, ผักกาดเขียว (*Brassica juncea* (L.) Czern.) และอ้อเล็ก (*Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steud.) โดยในข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 มีลำดับเป็น CysCysArgGluThrCysPheLysCys

เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของโปรตีน phytochelatin synthase ด้วย phylogenetic tree (Figure 4) พบว่า phytochelatin synthase จากข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ phytochelatin synthase ที่พบในพืชใบเลี้ยงเดี่ยว ได้แก่ ข้าวสาลี, อ้อเล็ก และ หญ้าแพรก (*Cynodon dactylon* (L.) Pers.) และยังจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับ ฐฤาษี (*Typha latifolia* L.) และ กระเทียม (*Allium sativum* L.) ซึ่งอยู่ในกลุ่มของพืชใบ เลี้ยงเดี่ยว ในขณะที่แยกออกจากกลุ่มพืชใบเลี้ยงคู่ ได้แก่ อะราบิดอฟซิส, ผักกาดเขียว, ถั่วเหลือง, birch-leaved pear, ผักกาดหอม (*Lactuca sativa* L.) และบัวหลวง

Table 2 Comparison of amino acid sequence similarity between Jasmine rice phytochelatin synthase and other phytochelatin synthase genes found in GenBank.

Accession No.	Plant species	Common name	Amino acids	%Identity
			Partial/Complete	
KJ200297	<i>Oryza sativa</i> L. spp. <i>indica</i> , cv. Khao Dawk Mali 105	Jasmine rice 105	290/-	100
EEC79817	<i>Oryza sativa</i> L.	Rice	290/415	99
AFU06381	<i>Phragmites australis</i> (Cav.) Trin. ex Steud.	Reed	287/498	69
AAO13810	<i>Cynodon dactylon</i> (L.) Pers.	Bermuda grass	291/504	65
Q9SWW5	<i>Triticum aestivum</i> L.	Wheat	289/500	71
AAG22095	<i>Typha latifolia</i> L.	Broadleaf cattail	296/421	52
BAN08523	<i>Nelumbo nucifera</i> Gaertn.	Sacred lotus	294/505	54
AAO13809	<i>Allium sativum</i> L.	Garlic	295/505	51
NP_001235576	<i>Glycine max</i> (L.) Merr.	Soybean	287/498	48
AAU93349	<i>Lactuca sativa</i> L.	Lettuce	279/490	46
AAD16046	<i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heynh.	Mouseear cress	274/485	45
CAC37692	<i>Brassica juncea</i> (L.) Czern.	Leaf mustard	274/485	46
AEY68568	<i>Pyrus betulifolia</i> Bunge.	Birch-leaved pear	286/497	49

Figure 3 Multiple alignment of amino acid sequences of phytochelatin synthases. The consensus CysCysXXXCysXXCys motif was identified (box region). Identical residues are represented by “*”, conserved substitution residues by “:”, semi-conserved substitution residues by “.”.

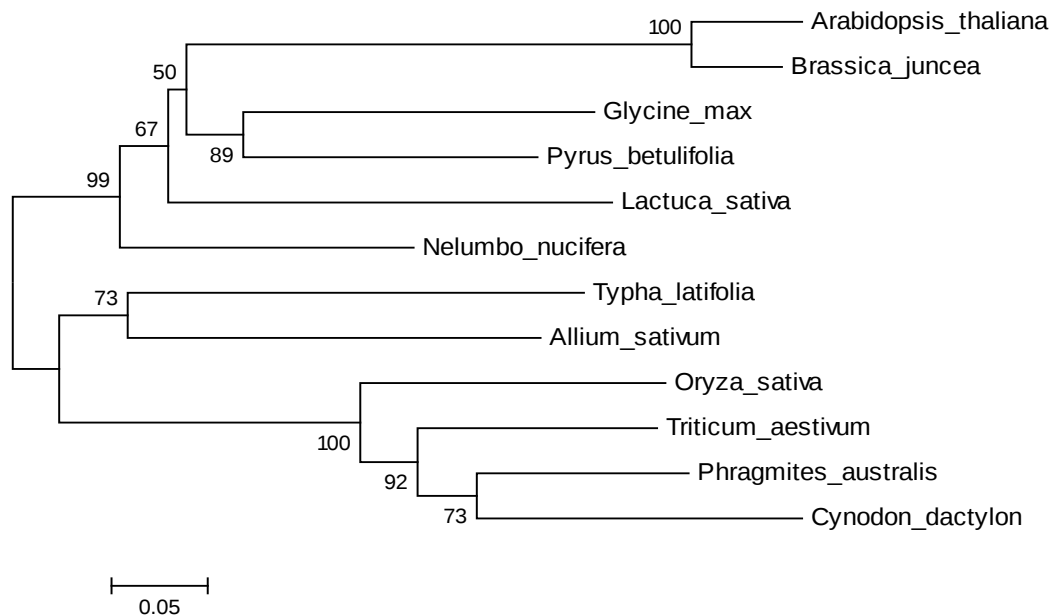


Figure 4 Phylogenetic tree of phytochelatin synthase amino acid sequences of twelve plant species. The tree was constructed by neighbor-joining method and the Poisson correction using MEGA 4.0 with a bootstrap number of 1000.

วิจารณ์ผลการทดลอง

เอนไซม์ arsenate reductase เป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญในกระบวนการลดความเป็นพิษของสารหนูที่เกิดขึ้นในเซลล์และเป็นเอนไซม์ที่จำเพาะต่อสารหนูเท่านั้น ไม่เกี่ยวข้องกับโลหะหนักอื่นๆ ดังนั้นการศึกษาวงจรการเมตาบอลิซึมของสารหนูที่เกี่ยวข้องกับ arsenate reductase ในข้าวสายพันธุ์ที่นิยมบริโภคในประเทศไทยจึงมีความสำคัญ ผลจากการศึกษาในครั้งนี้พบว่า ลำดับกรดอะมิโน arsenate reductase ของยีนที่ได้โคลนจากรากของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 มีขนาดต่างจากเอนไซม์ชนิดเดียวกันที่พบในพืชชนิดอื่นๆ ทั้งพืชชั้นต่ำ พืชใบเลี้ยงคู่ และใบเลี้ยงเดี่ยวซึ่งมีความยาว 130-139 เรสซิดิวส์ (Table 1) โดยมีลำดับกรดอะมิโนคล้ายกันคิดเป็นร้อยละ 48-85 อย่างไรก็ตาม พบว่า arsenate reductase ทั้งหมดมีลำดับกรดอะมิโนอนุรักษ์เป็นโมทีฟ (motif) คือ HisCys(X)₅Arg (Figure 1) ซึ่งเป็นลำดับกรดอะมิโนที่มีความสำคัญต่อการทำงานของเอนไซม์ arsenate reductase เมื่อทำให้เกิดการกลายที่กรดอะมิโนซิสเทอีน (cysteine) หรืออาร์จินีน (arginine) ในบริเวณโมทีฟ HisCys(X)₅Arg ของ arsenate reductase ในยีสต์ (*Saccharomyces cerevisiae* Meyen ex E.C. Hansen) พบว่าความสามารถในการทำ

ปฏิกิริยารีดักชันเปลี่ยนสารหนูในรูปของ arsenate (AsV) เป็น arsenite (AsIII) ของยีสต์ลดลง (Mukhopadhyay *et al.*, 2000; Mukhopadhyay and Rosen, 2001) แสดงให้เห็นว่าบริเวณโมทีฟดังกล่าวมีความสำคัญต่อการทำงานของเอนไซม์ ต่อมา Dhankher *et al.* (2006) รายงานว่าเมื่อยับยั้งการแสดงออกของยีน *arsenate reductase* (*AtACR2*) ในอะราบิดอพซิส ด้วยเทคนิค RNA interference (RNAi) พบการสะสมสารหนูบริเวณยอดมากขึ้น และอะราบิดอพซิสสามารถทนต่อสภาพแวดล้อมที่มีการปนเปื้อนของสารหนูได้น้อยลง นอกจากนี้ยังพบการทำงานของเอนไซม์ arsenate reductase (Acr2p) ในเซลล์รากของกุศตหมากอยู่ในระดับสูงเมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อในส่วนอื่น (Duan *et al.*, 2005) เมื่อเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ arsenate reductase ของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 กับโปรตีน arsenate reductase ที่มีรายงานในฐานข้อมูล พบว่ามีความคล้ายคลึงกับโปรตีนของพืชชนิดอื่น ได้แก่ Cdc25 (dual specificity phosphatase) ใน purple false brome (82%) และอะราบิดอพซิส (59%) โดยลำดับกรดอะมิโนพบบริเวณโมทีฟ HisCys(X)₅Arg นอกจากนี้ arsenate reductase ในโปรโตซัว *Leishmania major* (LmACR2) มีคุณสมบัติเป็นเอนไซม์ reductase แล้วยังมี

คุณสมบัติเป็นเอนไซม์ phosphatase ด้วย (Zhou *et al.*, 2006)

สำหรับ phytochelatin synthase เป็นเอนไซม์ที่ลดความเป็นพิษของสารหนูโดยเข้าจับกับสารหนูที่อยู่ในรูปของ arsenite (AsIII) แล้วนำสารประกอบนี้เข้าสู่แวคิวโอลเพื่อลดความเป็นพิษของสารต่อเซลล์ (Waqar *et al.*, 2009) เมื่อพิจารณาความเหมือนและต่างของลำดับกรดอะมิโนของ phytochelatin synthase ที่ได้จากรากของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 กับพืชอีก 11 ชนิด พบว่าลำดับกรดอะมิโนมีความแตกต่างกันในบริเวณปลาย C-terminus ของ phytochelatin synthase และพบลำดับกรดอะมิโนอนุรักษ CysCysXXXCysXXCys (Figure 3) ซึ่งตรงกับรายงานของ Chang *et al.* (2012) ที่ได้ศึกษายีน *phytochelatin synthase* ใน birch-leaf pear (*Pyrus betulaefolia* Bunge) โดยพบว่าในบริเวณ C-terminus ของ phytochelatin synthase ของ birch-leaf pear นั้นมีลำดับกรดอะมิโนแตกต่างกับ phytochelatin synthase ในพืชชนิดอื่นและพบบริเวณโมทิฟซึ่งมีลำดับกรดอะมิโนอนุรักษเป็น Cys³⁶⁹Cys³⁷⁰GlnGluThrCys³⁷⁴ValLysCys³⁷⁷ นอกจากนี้ Vestergaard *et al.* (2008) รายงานว่า โมทิฟซึ่งอยู่บริเวณ C-terminus นี้มีความสำคัญต่อการทำงานของ phytochelatin synthase โดยจะเป็นบริเวณที่ตรวจจับกับโลหะหนักแคดเมียมและสังกะสีโลหะหนักไปยังบริเวณอนุรักษของ N-terminus ก่อนที่จะรวมกันเป็น complex แล้วเข้าไปสะสมในแวคิวโอล และยังช่วยในการรักษาเสถียรภาพของเอนไซม์อีกด้วย (Ruotolo *et al.*, 2004) ผลจากการศึกษาในอะราบิโดพซิสสายพันธุ์กลาย *cad1-3* (cadmium sensitive) ซึ่งไม่มีการแสดงออกของ phytochelatin synthase พบว่าพืชที่เป็นสายพันธุ์กลายนี้มีความสามารถทนต่อสารหนูได้ไม่ดีเท่ากับต้นที่เป็น wild type แสดงให้เห็นถึงความสำคัญของ phytochelatin synthase ที่ทำให้พืชสามารถทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ปนเปื้อนสารหนู (Ha *et al.*, 1999)

ผลจากการโคลนยีน *arsenate reductase* และ *phytochelatin synthase* ที่ตอบสนองต่อสารหนูจากรากของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 พบว่า *arsenate reductase* นั้น จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับพืชใบเลี้ยงเดี่ยวหลายชนิดทั้งยังพบบริเวณอนุรักษ HisCys(X)₅Arg ซึ่งมีความสำคัญต่อการทำงานของเอนไซม์ ส่วนการโคลนยีน *phytochelatin*

synthase จากรากของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 บริเวณปลาย 3' ซึ่งกำหนดการสร้างสายโพลีเปปไทด์ในส่วนปลาย C-terminal ได้ความยาวของกรดอะมิโน 290 เรสซิดูส์ พบว่าลำดับกรดอะมิโนในบริเวณนี้มีความแตกต่างกันในระหว่าง phytochelatin synthase ของพืชหลายชนิด และยังพบกรดอะมิโนส่วนอนุรักษ CysCys(X)₃Cys(X)₂Cys บริเวณปลาย C-terminus ซึ่งมีหน้าที่สำคัญในการจับกับโลหะหนักและสารหนู เนื่องจากสารหนูมีผลกระทบโดยตรงกับการเจริญเติบโตของข้าว ดังนั้น การศึกษาและวิเคราะห์ยีน *arsenate reductase* และ *phytochelatin synthase* ที่เกี่ยวข้องกับขบวนการเมตาบอลิซึมของสารหนู จึงมีความสำคัญต่อการลดความเป็นพิษของสารหนูในเซลล์ และการเจริญเติบโตของข้าว ซึ่งข้อมูลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้สามารถนำไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวที่ทนต่อสารหนู โดยการคัดเลือกพันธุ์ที่มีความไวต่อการกำจัดสารหนู หรือการส่งเสริมการแสดงออกของยีนทั้งสองชนิดโดยวิธีทางพันธุวิศวกรรม

กิตติกรรมประกาศ

คณะทำงานวิจัยขอขอบคุณ ห้องปฏิบัติการเภสัชวิทยา และห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ และภาควิชาพันธุศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ร่วมทำงานวิจัยและสนับสนุนงบประมาณ

เอกสารอ้างอิง

- Chang YH, Cong H, Li Y, Lin J, Sheng BL (2012) Characterization and expression of a phytochelatin synthase gene in Birch-leaf Pear (*Pyrus betulaefolia* Bunge). *Plant Mol Biol* 30: 1329–1337.
- Cobbett C, Goldsbrough P (2002) Phytochelatin and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annu Rev Plant Biol* 53: 159–182.
- Dhankher OP, Rosen BP, McKinney EC, Meagher RB (2006) Hyperaccumulation of arsenic in the shoots of *Arabidopsis* silenced for arsenate reductase, ACR2. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 5413–5418.

- Duan GL, Zhu YJ, Tong YP, Cai C, Kneer R (2005) Characterization of arsenate reductase in the extract of roots and fronds of Chinese brake fern, an arsenic hyperaccumulator. *Plant Physiol* 138: 461–469.
- Ghosh M, Shen J, Rosen BP (1999) Pathways of As (III) detoxification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 5001–5006.
- Ha S, Smith AP, Howden R, Dietrich WM, Bugg S, O'Connell MJ, Goldsbrough PB, Cobbett CS (1999) Phytochelatin synthase genes from *Arabidopsis* and the yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Plant Cell* 11: 1153–1163.
- May MJ, Vernoux T, Leaver C, Montagu M, Inze D (1998) Glutathione homeostasis in plants: implications for environmental sensing and plant development. *J Exp Bot* 49: 649–667.
- Meharg A (2004) Arsenic in rice-understanding a new disaster for South-East Asia. *Trends Plant Sci* 9: 415–417.
- Meharg A, Sun G, Williams PN, Adomako E, Deacon C, Zhu YG (2008) Inorganic arsenic levels in baby rice are of concern. *Environ Pollut* 152: 746–749.
- Mukhopadhyay R, Shi J, Rosen BP (2000) Purification and characterization of Acr2p, the *Saccharomyces cerevisiae* arsenate reductase. *J Biol Chem* 275: 21149–21157.
- Mukhopadhyay R, Rosen BP (2001) The phosphatase C(X)₅R motif is required for catalytic activity of the *Saccharomyces cerevisiae* Acr2p arsenate reductase. *J Biol Chem* 276: 34738–34742.
- Mukhopadhyay R, Rosen BP (2002) Arsenate reductases in prokaryotes and eukaryotes. *Environ Health Perspect* 110: 745–748.
- Nocito FF, Lancilli C, Crema B, Fourcroy P, Davidian J, Sacchi GA (2006) Heavy metal stress and sulphate uptake in maize roots. *Plant Physiol* 141: 1138–1148.
- Radabaugh TR, Aposhian HV (2000) Enzymatic reduction of arsenic compounds in mammalian systems: reduction of arsenate to arsenite by human liver arsenate reductase. *Chem Res Toxicol* 13: 26–30.
- Ruotolo R, Peracchi A, Bolchi A, Infusini G, Amoresano A, Ottonello S (2004) Domain organization of phytochelatin synthase. *J Biol Chem* 279: 14686–14693.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. *Mol Biol Evol* 24: 1596–1599.
- Vestergaard M, Matsumoto S, Nishikori S, Shiraki K, Hirata K, Takagi M (2008) Chelation of cadmium ions by phytochelatin synthase: role of the cystein-rich C-terminal. *Anal Sci* 24: 277–281.
- Sambrook J, Russell DW (2001) Molecular cloning: A laboratory manual. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sharma SS, Dietz K (2008) The relationship between metal toxicity and cellular redox imbalance. *Trends Plant Sci* 14: 43–50.
- Wargar A, Isayenkov SV, Maathuis FJM, Zhao FJ (2009) Arsenite transport in plants. *Cell Mol Life Sci* 66: 2329–2339.
- Zhao FJ, Ma JF, Meharg A, McGrath SP (2008) Arsenic uptake and metabolism in plants. *New Phytol* 181: 777–789.
- Zhou Y, Messier N, Ouellette M, Rosen BP, Mukhopadhyay R (2004) Leishmania major LmACR2 is a pentavalent antimony reductase that confers sensitivity to the drug Pentostam. *J Biol Chem* 279: 37445–37451.