KSUC-P-011

การวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนและฤทธิ์ต้านจุลชีพของคาเธลิซิดินจากกบนา

ชุติมา การมงคล[1] ปิยะฉัตร วิริยะอำไพวงศ์[1] ณัฐพงษ์ ศรีสมุทร[1] และ อนุพงษ์ ทานกระโทก[1,*]
[1] สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยกาฬสินธุ์
[*]Corresponding author: anupong2.ta@ksu.ac.th

บทคัดย่อ

คาเธลิซิดินเป็นเปปไทด์ที่ทำหน้าที่ระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์ที่มีกระดูกสันหลัง ซึ่งคาเธลิซิดินถูกพบในสัตว์หลายสายพันธุ์ เช่น สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ปลา นก สัตว์เลื้อยคลาน และสัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ และจากการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับคาเธลิซิดินในสัตว์สะเทินบกสะเทินน้ำ พบว่ามีเพียง 10 ชนิด และส่วนมากยังไม่มีการศึกษาถึงกลไกการทำงาน ดังนั้นเพื่อที่จะตรวจสอบความสามารถในการเป็นเปปไทด์ต้านจุลชีพของคาเธลิซิดินจากกบนา (cathelicidin-RT) ลำดับกรดอะมิโนของคาเธลิซิดินจากกบนาจึงถูกนำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้ จากผลการศึกษาพบว่า เมื่อวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของคาเธลิซิดินจากกบนามีความเหมือนกับ cathelicidin-PY1 precursor (*Nanorana yunnanensis*) ถึง 62 % จากการจำลองโครงสร้างสามมิติของคาเธลิซิดินของกบนาแสดงลักษณะโครงสร้างโดยทั่วไปคล้ายคลึงกับคาเธลิซิดินอื่น ๆ จากการวิเคราะห์บริเวณที่สามารถเป็น antimicrobial peptide ทำให้ได้บริเวณของเปปไทด์จาก cathelicidin-RT คือ PCR12 และ LT12 มาใช้ในการทดสอบ ซึ่งพบว่าเปปไทด์ PCR12 และ LT12 มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อได้เพียง 10 % อย่างไรก็ เปปไทด์ดังกล่าวสามารถนำไปใช้เพื่อเป็นต้นแบบในการออกแบบเปปไทด์ให้มีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพที่ดียิ่งขึ้นต่อไปได้

คำสำคัญ: คาเธลิซิดิน เปปไทด์ต้านจุลชีพ กบนา

Abstract

Cathelicidin is the peptide that play role in vertebrate immunity, which are found in many species such as mammals, fish, birds, reptiles and amphibians. Nowadays, amphibian cathelicidin-like antimicrobial peptides have been identified from only 10 species and some of these cathelicidins have not yet been functionally characterized. To investigate the antimicrobial activity of *H. rugulosus* cathelicidin (cathelicidin-RT). The cathelicidin-RT amino acid sequence and was analyzed in this study. The results found that, the cathelicidin-RT amino acid sequence was similar to cathelicidin-PY1 precursor (*Nanorana yunnanensis*) about

62 %. The molecular modeling presented the common structure as other cathelicidin structures. The antimicrobial sequence scanning system analysis employed 2 stretch from cathelicidin-RT (PCR12 and LT12) represents a candidate antimicrobial peptide. PCR12 and LT12 peptides showed only 10 % of bacterial growth inhibition. However, both peptide can be used as the template for designing of the high potential antimicrobial peptide.

Keywords: Cathelicidin, Antimicrobial Peptide and *Hoplobatrachus rugulosus*

บทนำ

ในช่วงหลายสิบปีที่ผ่านมาในวงการแพทย์พบการดื้อยาปฏิชีวนะเพิ่มมากขึ้นเรื่อย ๆ ดังนั้นจึงจำเป็นอย่างยิ่งที่จะค้นหาสารทดแทนเพื่อทำหน้าที่ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรคไม่ว่าจะเป็นการตรวจหาสารสกัดจากพืชสมุนไพรหรือการสกัดสารที่ได้จากสัตว์ ทั้งนี้การใช้ยาปฏิชีวนะที่ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมีเพื่อให้โครงสร้างใกล้เคียงกับยาปฏิชีวนะที่เคยใช้อยู่เดิมเพื่อฆ่าเชื้อโรคนั้นก่อปัญหาการดื้อยาของจุลินทรีย์ก่อโรคได้เช่นกัน (Blair *et al*., 2015) ดังนั้นจึงจำเป็นที่ต้อง มีการค้นหาสารใหม่ที่ได้จากธรรมชาติและให้ผลการยับยั้งเชื้อได้เช่นเดียวกับยาปฏิชีวนะ แต่ไม่ส่งผลให้เชื้อเกิดการดื้อยา (Teixeira *et al*., 2012)

คาเธลิซิดินเป็นกลุ่มของเปปไทด์ที่มีความหลากหลายทางโครงสร้างและสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ได้ พบในสัตว์มีกระดูกสันหลังเกือบทุกชนิด คาเธลิซิดินถูกพบครั้งแรกจาก นิวโทรฟิว (neutrophil) ของวัว จากนั้นมีการพบคาเธลิซิดินเป็นจำนวนมากในกลุ่มสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม โดยทั่วไปแล้วโครงสร้างของคาเธลิซิดินจะประกอบด้วยลำดับสัญญาณ (signal sequence) ทางด้าน N-terminus ประมาณ 30 residue ต่อด้วยบริเวณอนุรักษ์ (conserve domain) และส่วนท้ายทางด้านปลาย C-terminus ทำหน้าที่เป็นเปปไทด์คาเธลิซิดิน นอกจากความสามารถในการเป็นสารยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์แล้ว คาเธลิซิดินสามารถชักนำให้เกิดการสร้างหลอดเลือดใหม่ (angiogenesis) อีกทั้งช่วยการเกิดการเคลื่อนที่เข้าหาสิ่งกระตุ้น chemotaxis ของ นิวโตรฟิวส์ (neutrophils) โมโนไซต์ (monocytes) มาสต์เซลล์ (mast cells) และ ทีเซลล์ (T cells) และสามารถยับยั้งการเกิด อะพอพโทซิส (apoptosis) (Bals and Wilson, 2003)

ปัจจุบันพบว่า การศึกษาการทำงานของคาเธลิซิดินในกบนั้นมีเพียงไม่กี่ชนิด เช่น กบบลูฟร็อก (*Rana catesbeiana*) (Ling *et al*., 2014) กบทูด (*Limnonectes fragilis*) (Yu *et al*., 2013) กบ (*Amolops loloensis*) (Hao *et al*., 2012) และกบ (*Paa yunnanensis*) (Wei *et al*., 2013) จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าเปปไทด์คาเธลิซิดินจากกบหลายสายพันธุ์มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ได้ อีกทั้งเปปไทด์คาเธลิซิดินจากกบบางชนิดสามารถมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ (Anti-inflamatory) (Mu *et al*., 2017) ได้ ในงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะศึกษาการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของคาเธลิซิดินในกบนาที่พบได้ในท้องถิ่นของไทย และทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ของเปปไทด์ที่ได้มาจากลำดับกรดอะมิโนของคาเธลิซิดินในกบนา เพื่อให้เกิดประโยชน์สูงสุดในการนำไปใช้ในอนาคต

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของคาเธลิซิดินจากกบนา
2. เพื่อศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ของเปปไทด์จากลำดับกรดอะมิโนของคาเธลิซิดินจากกบนา

วิธีดำเนินการวิจัย

วิเคราะห์ผลลำดับลำดับกรดอะมิโนของคาเธลิซิดิน

ทำการรวบรวมลำดับของกรดอะมิโนของคาเธลิซิดินจากกบที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/) จากนั้นทำการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของคาเธลิซิดินจากกบนากับคาเธลิซิดินอื่นด้วยการทำ Amino acid sequence alignment และ Phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม ClustalOmega ทำนายโครงสร้างตติยภูมิของคาเธลิซิดินจากกบนาโดยโปรแกรม I-TASSER server (https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/) และทำนายบริเวณลำดับของกรดอะมิโนที่คาดว่าน่าจะมีความสามารถในการเป็น antimicrobial peptide ด้วยโปรแกรม Antimicrobial Sequence Scanning System (http://tcoffee.crg.cat/apps/ampa/do:ampa)

การตรวจสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของเปปไทด์คาเธลิซิดินในการเป็น antimicrobial peptide ด้วยวิธี Broth assay

ทำการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ 12 สายพันธุ์ ได้แก่ *Bacillus megaterium* TISTR067, *Bacillus subtilis* TISTR124, *Bacillus cereus* TISTR1449, *Staphylococcus aureus* TISTR746, *Enterococcus faecalis* TISTR927, *Pseudomonas aeruginosa* TISTR1287 *Salmonella thyphimurium* TISTR147, *Candida albicans* TISTR5554, *Aeromonas hydrophila* TISTR1321, *Salmonella derby* DMST16881 และ *Edwardsiella tarda* DMST38217 ในอาหาร Mueller-hinton broth (MHB) ที่ 37 องศาเซลเซียส ให้อยู่ในช่วง mid Log phase แล้วทำการเจือจางเชื้อด้วย PBS buffer pH 7.2 ให้ได้สารละลายแบคทีเรีย 10^4 CFU/ml เติมสารละลายแบคทีเรีย 5 ไมโครลิตร ลงใน tube PCR แล้วเติมสารละลายเปปไทด์ จำนวน 5 ไมโครลิตร ลงใน tube PCR (ชุดควบคุมใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายเปปไทด์) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้น เติม MHB 90 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง นำไปวัดค่า OD_{600nm} ค่าร้อยละของการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์คำนวณได้จากสูตร growth inhibition (%) = [(OD_{600nm}, ชุดควบคุม– OD_{600nm}, เปปไทด์) / OD_{600nm}, ชุดควบคุม] × 100

ผลการวิจัยและอภิปลายผล

การวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของคาเธลิซิดินจากกบนา

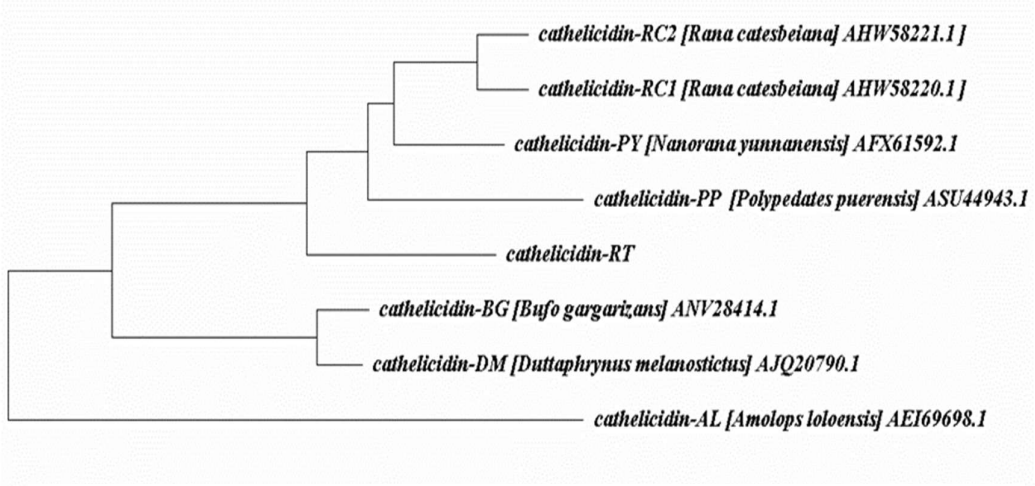
จากผลการทำ alignment พบว่าคาเธลิซิดินจากกบนา (cathelicidin-RT) มีความเหมือนกับ cathelicidin-PY1 precursor (*Nanorana yunnanensis*) 62% มีความเหมือนกับ cathelicidin-RC2 preproprotein ของ *R. catesbeiana* 54% มีความเหมือนกับ cathelicidin-BG (*Bufo gargarizans*) และ cathelicidin-DM (*Duttaphrynus melanostictus*) อยู่ 41% และ 39% ตามลำดับ (ภาพที่ 1) จะเห็นได้ว่าทางด้าน N-terminal cathelin domain จะมีลักษณะ conserve อย่างมาก โดยเฉพาะลำดับกรดอะมิโนที่มาจากสปีชีส์ที่ใกล้เคียงกัน แต่ด้าน C-terminal cathelicidin domain แสดงให้เห็นถึงความผันแปรของลำดับกรดอะมิโน จากผลการเปรียบเทียบความสัมพันธ์ของลำดับกรดอะมิโนของคาเธลิซิดินสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก (ภาพที่ 2) สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 cluster โดย cluster I ประกอบด้วย cathelicidin-RC1 cathelicidin-RC2 จากกบบูลฟร็อก cathelicidin-PY จากกบ yunnan spiny cathelicidin-PP จากปาด (*Polypedates puerensis*) และ cathelicidin-RT จากกบนา cluster II ประกอบด้วย cathelicidin-BG จาก Asiatic toad และ cathelicidin-DM จากคางคกบ้าน และ cluster III ซึ่งเป็นคาเธลิซิดินที่มีลำดับกรดอะมิโนแตกต่างจากคาเธลิซิดินอื่น คือ cathelicidin-AL จาก rufous-spotted torrent frog (*Amolops loloensis*)

```
cathelicidin-BG          MRSWWLSLLLVSAVTLHGCLSDTAEPEVQDGRSIGDVIDLYNQREGVTYLYKSLDQLPPV
cathelicidin-DM          MRSWRLSLLLVSAVTLHGCLSDPAEPEVQDGRSIEDVIDLYNQREGVTYLYKSLDQLPPV
cathelicidin-RT          MKIWQC-VFWIFAITLQSAHSESPD----QDEWIREALDLYNQKDNGKCFYKQLSDLPAG
NP-CATH1                 MKVWQC-ALWISALTLQAARSQSPD----REEWIKEALDLYNQREDGEFFFKFLSDLPAA
cathelicidin-PY1         MKVWQC-VLWISALTLQMARSQSPD----QDGWIREALDLYNQREDGEFFFKFLSDLPDV
NP-CATH2                 MKVWQC-ALWISALTLQAARSQSPD----REEWIREALDLYNQREDGEFFFKFLSDLPAA
NP-CATH3                 MKVWQC-ALWISALTLQAARSQSPD----REEWIKEALDLYNQREDGEFFFKFLSDLPAA
cathelicidin-RC2         MKIWQC-VVWLCAITLEVAHSQSPD----REGWITEALDLYNQREDGEFLFKLLSELPAP
cathelicidin-RC1         MKIWQC-VVWLCAITLEVAHSQSPD----REGWIREALDLYNQREDGEFLFKLLSELPGP
                         *: *    . : *:**. . *:  :        * :.:*****::.   ::* *.:**

cathelicidin-BG          PMEEDENPNRRGFIIKETVCLKSENPDLTQCDFKPDGDVKICSLDLGDE-DPEDIMCTSL
cathelicidin-DM          PMEEDENPNRRGFIMKETVCLKSENPDLTQCDFKPDGDVKICSLDLGDE-DPEDIMCFSL
cathelicidin-RT          ILEEEEDSPTVRFFIKETECLKSEDIDLAQCDYKKDGQVKACALYPEEGETSKTLKCVSL
NP-CATH1                 PLEEE-NNPTIAFLIKETECLKSEDINLEECDYKKDGEVKVCGLYPAEGETMKTLKCVGL
cathelicidin-PY1         LLEEEGDSPAIGFLIKETDCPKSEDCDLEKCDYRKDGEVKVCTLYREEE----DVKCVSL
NP-CATH2                 PLEEEGDSPAIGFLIKETDCPKSEDCDLEKRDYRKDGEVKVCALYREEE----DVKCVSL
NP-CATH3                 PLEEEGDSPAIGFLIKETDCPKSEDCDLEKRDYRKDGEVKVCALYREEE----DVKCVSL
cathelicidin-RC2         LLEEEGDSPAIGFLIKETDCPKSEENDLEGCDYSKDGEVKVCALHREDE----DVKCVSL
cathelicidin-RC1         LLEEEGDSPAIGFLIKETDCPKSEEIDLERCDYSKDGEVKVCALHQEEQ----DVKCVSL
                          :**: :     *::*** * ***: :*   *:  **:** * *   :      : * .*

cathelicidin-BG          NKEVRVKRSNRRRPCRGRSCSPWLRGAYTL----IGRPAKNQNRPKYMWV----
cathelicidin-DM          NKEVRMKRSSRRKPCKGWLCKLKLRGGYTL----IGSA-TNLNRPTYVRA----
cathelicidin-RT          TKTSRVKRSNRSQPCRGIFCRTGS-------RSPIAKP----SKDNLVRMSLS-
NP-CATH1                 TKANGKAESAVKI-VK-NVCKKAQ---SDGKDQ--WKAILQWRNTPTVGMDSSC
cathelicidin-PY1         SKNSRTRRAGTKRKCN-FLCKLKEKLRTVITS-HIDK-VLRPQG----------
NP-CATH2                 SKDSRTRRSGTKRNCN-FLCKVKQRLRSASSTSHIGMAIPRPRG----------
NP-CATH3                 SKDSRTRRSGTKRNCN-FLCKVKQRLRSASSTSHIGMAIPRPRG----------
cathelicidin-RC2         TAENSRSKRSSNKKCG-FFCKLKNKLKSTGSRSNIAAG--THGGTFRV------
cathelicidin-RC1         TENSRSKRSSKKKKCK-FFCKVKKKIKSIGFQIPIVSI--PFK-----------
                         .    .          *
```

จาก *Duttaphrynus melanostictus*, cathelicidin-PY1 จาก *Nanorana yunnanensis*, NP-CATH1 NP-CATH2 และ NP-CATH3 จาก *Nanorana parkeri*, cathelicidin-RC1 และ cathelicidin-RC2 จาก *R. catesbeiana* และ cathelicidin-RT จากกบนา

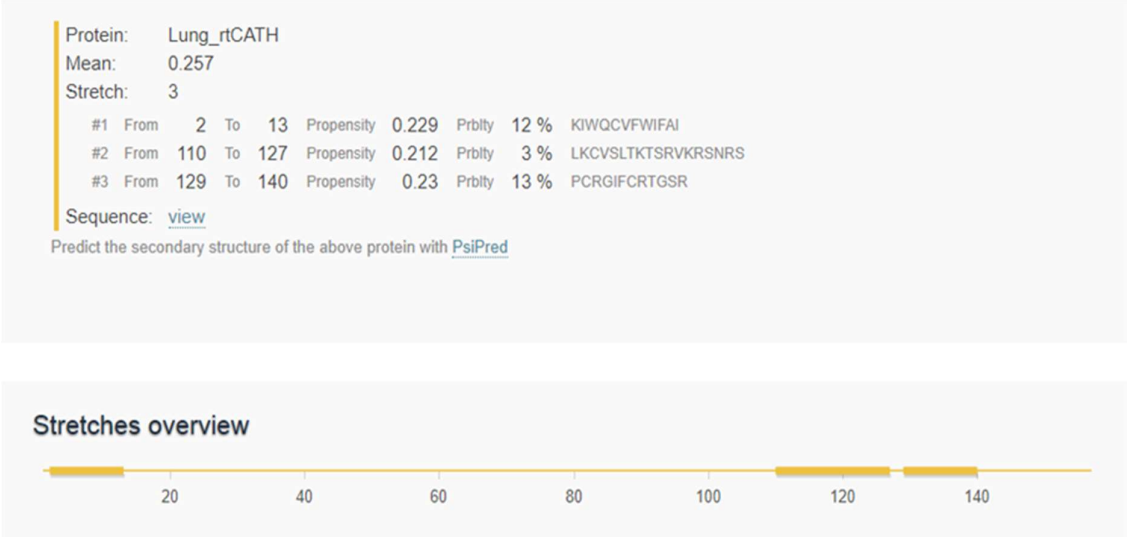


ภาพที่ 2 ผลการวิเคราะห์ phylogenetic tree ลำดับกรดอะมิโนของคาเธลิซิดินจากกบนา (cathelicidin-RT) กับคาเธลิซิดินของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกอื่น ๆ

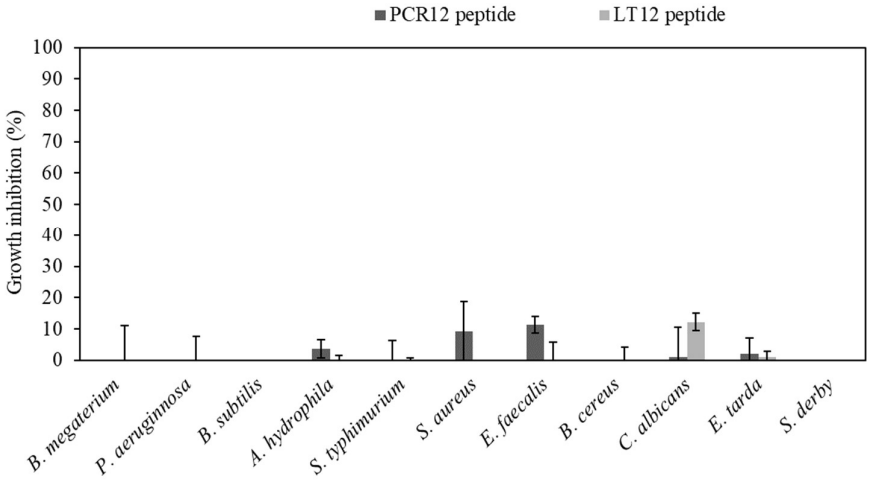
เมื่อนำลำดับกรดอะมิโนของ cathelicidin-RT คาเธลิซิดินมาทำนายโครงสร้างตติยภูมิด้วยโปรแกรม I-TASSER server โครงสร้างสามมิติโดยทั่วไปมีลักษณะเหมือนกันคาเธลิซิดินอื่นๆ ที่มีการศึกษาโครงสร้างสามมิติมาแล้ว โดยเฉพาะ ส่วน N-terminal cathelin domain ที่มีลักษณะ conserve แต่เนื่องจาก C-terminal cathelicidin domain ของแต่ละ สปีชีส์นั้นมีความแตกต่างกัน ทำให้โครงสร้างของ cathelicidin-RT ประกอบ α-helix 1 สาย และ β-strand 4 สาย อีกทั้งพันธะไดซัลไฟด์ 2 พันธะ (ภาพที่ 3)

ภาพที่ 3 ผลการทำนายโครงสร้างสามมิติคาเธลิซิดินจากกบนา (cathelicidin-RT) ด้วย I-TASSER program signal peptide (สีดำ) cathelin domain (สีเทา) cathelicidin (หมู่แขนงข้างสีดำ)

ผลจากการนำลำดับกรดอะมิโนของ cathelicidin-RT วิเคราะห์บริเวณที่สามารถเป็น antimicrobial peptide ด้วย Antimicrobial Sequence Scanning System พบว่าลำดับกรดอะมิโนบริเวณ NH_2-PCRGIFCRTGSR-COOH (PCR12) และ NH_2-LTKTSRVKRSNR-COOH (LT12) มีลักษณะของ bactericidal stretches ด้วย 13% และ 3% probability ตามลำดับ (ภาพที่ 4) ดังนั้นจึงได้ทำการสั่งสังเคราะห์เปปไทด์ทั้งสองเพื่อนำมาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ต่อไป



ภาพที่ 4 ผลการวิเคราะห์บริเวณของลำดับกรดอะมิโนของคาเธลิซิดินจากกบนา (cathelicidin-RT) ที่คาดว่าจะเป็น Antimicrobial peptide



ภาพที่ 5 ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ของเปปไทด์คาเธลิซิดินจากกบนา (PCR12 peptide และ LT12 peptide)

ศึกษาคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ของเปปไทด์คาเธลิซิดินจากกบนา

เปปไทด์ LT12 และ PCR12 ที่ได้จากการสังเคราะห์ ถูกนำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์เบื้องต้น โดยวิธี broth assay ผลการทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์พบว่ามีเพียงเปปไทด์ PCR12 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* TISTR746 และ *E. faecalis* TISTR927 ได้เพียง 10 % อีกทั้ง เปปไทด์ LT12 มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. albicans* TISTR5554 ได้เพียง 10% เช่นเดียวกัน (ภาพที่ 5)

สรุปผลการวิจัย

งานวิจัยนี้ได้ทำการวิเคราะห์หาลำดับกรดอะมิโนของคาเธลิซิดินจากกบนา (cathelicidin-RT) เพื่อค้นหาลำดับกรดอะมิโนของ cathelicidin-RT ที่คาดว่าน่าจะมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลชีพ จากการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของ cathelicidin-RT พบว่าเปปไทด์ PCR12 และ LT12 มีความเป็นไปได้ที่จะเป็นเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ดังกล่าว แต่เมื่อทำการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทีย์ของเปปไทด์ดังกล่าว พบว่าสามารถยั้บยั้งเชื้อจุลินทีย์ได้เพียงเล็กน้อย อย่างไรก็ตามเปปไทด์ทั้งสองรูปแบบนั้น สามารถใช้เป็นเส้นแม่แบบในการออกแบบเปปไทด์ให้มีฤทธิ์ที่ดียิ่งขึ้นต่อไปได้ เพื่อการนำไปใช้ประโยชน์ในการสร้างเปปไทด์ต้านจุลชีพตัวใหม่ต่อไปในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

Bals R and Wilson JM. (2003). *Cathelicidins – a family of multifunctional antimicrobial peptides*. Cell. Mol. Life Sci., 60(4), 711–720.

Blair JM, Webber MA, Baylay AJ, Ogbolu DO, Piddock LJ. (2015) Molecular mechanisms of antibiotic resistance. Nat Rev Microbiol. 13(1): 42-51.

Hao X, Yang H, Wei L, Yang S, Zhu W, et al. (2012). *Amphibian cathelicidin fills the evolutionary gap of cathelicidin in vertebrate*. Amino Acids, 43, 677–85.

Ling G, Gao J, Zhang S, Xie Z, Wei L, Yu H, Wang Y. (2014). *Cathelicidins from the bullfrog Rana catesbeiana provides novel template for peptide antibiotic design.* PLoS One, 9, e93216.

Mu L1, Zhou L2, Yang J3, Zhuang L4, Tang J1, Liu T1, Wu J5, Yang H6. (2017) The first identified cathelicidin from tree frogs possesses anti-inflammatory and partial LPS neutralization activities. Amino Acids. 49(9):1571-1585.

Teixeira V, Feio MJ, Bastos M. (2012). *Role of lipids in the interaction of antimicrobial peptides with membranes*. Prog. Lipid Res., 51(2), 149–177.

Wei L, Yang J, He X, Mo G, Hong J, et al. (2013). *Structure and function of a potent lipopolysaccharide-binding antimicrobial and anti-inflammatory peptide*. J Med Chem., 56, 3546–56.

Yu H, Cai S, Gao J, Zhang S, Lu Y, Qiao X, Yang H, Wang Y. (2013). *Identification and polymorphism discovery of the cathelicidins, Lf-CATHs in ranid amphibian (Limnonectes fragilis).* FEBS J., 280(23), 6022-6032.