

บทคัดย่อ

1. พันธุศาสตร์ของเอนไซม์ที่เป็นเป้าหมายของยาปราบศัตรูพืช

ยีนที่ศึกษาคือ ยีนที่ผลิตเอนไซม์ 4-Hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (HPPD) เรียกว่า ยีน *hpdA* เอนไซม์ HPPD นี้ เป็นเป้าหมายของยาปราบศัตรูพืช และมีความสำคัญในขบวนการเมตาบอลิซึมของกรดอะมิโนไทโรซีน พบยีนควบคุมอยู่ใกล้กันตั้งชื่อว่า ยีน *hpdR* เมื่อยีน *hpdA* ถูกทำลายไป จะเกิดการสะสมของสารตั้งต้นคือ HPP (Hydroxyphenylpyruvate) ในขณะทำการทำลาย *HpdR* ซึ่งเป็นตัวควบคุมการแสดงออกของ *hpdA* ทำให้เกิดการสะสมของ HPP เช่นกัน ส่วนยาปราบศัตรูพืชในกลุ่ม Isoxaflutole นั้นมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ HPPD ของเชื้อ *S. meliloti* ได้จริง พบว่าบริเวณตั้งแต่ -70 ถึง -132 จาก ATG ของยีน *hpdA* นั้นมีความจำเป็น มี direct repeated sequence 2 ชุด ซึ่งมีความคล้ายคลึงกัน เรียกว่า S1 และ S2 พิสูจน์ว่า *HpdR* จับกับ *hpdA* promoter จริง ครอบคลุมบริเวณ S1 และ S2 ด้วย เมื่อสัมผัสกับสารกระตุ้นคือ HPP ทำให้ *HpdR* เปลี่ยนแปลงรูปร่างและการจับ เกิดการกระตุ้นให้มีการแสดงออก ของยีน *hpdA*

2. การค้นพบยีนเพื่อพัฒนาเป็นไบโอเซนเซอร์

ได้ใช้เทคนิคเรียกว่า Transposon Random Integration พบ clone ที่มีการตอบสนองต่อยาฆ่าแมลง Chlorpyrifos (CPF) ในระดับสูงมาก มีการเรียงตัวของยีนอยู่บน plasmid pSymB ดังนี้ *chpR-chpA-chpA1* เมื่อทำลายยีน *chpR* แล้วพบว่า *chpA* promoter induce ไม่ได้ แสดงว่า *ChpR* เป็นตัวควบคุมการแสดงออกของยีน *chpA* เมื่อทำให้เซลล์มีปริมาณ *ChpR* สูงขึ้นพบว่าทำให้เชื้อ *S. meliloti* มีความไวต่อ CPF มากขึ้น นอกจากนี้ได้ค้นพบยีนที่คล้ายกับ *chpA1* อีกคู่หนึ่งอยู่บน plasmid เดียวกัน ห่างออกไปประมาณ 232 kbp เรียกว่า *chpBB1* ทั้ง *ChpAB* และ *ChpA1B1* มีความเหมือนกันในระดับกรดอะมิโนที่ 50 และ 68% ตามลำดับ เมื่อทำให้เซลล์มีปริมาณ *ChpBB1* สูงขึ้นทำให้เชื้อมีความต้านทานต่อ CPF สูงขึ้น ซึ่งความสามารถเช่นนี้ต้องการ *ChpR* และ *ChpAA1* ด้วย จึงมีความเป็นไปได้ว่า *ChpA* และ *ChpA1* เปลี่ยน CPF เป็นสารที่มีความเป็นพิษสูงขึ้น ในขณะที่ *ChpBB1* ทำหน้าที่เปลี่ยนต่อให้สารนั้นมีความเป็นพิษน้อยลง กล่าวโดยสรุปคือได้ค้นพบยีนใหม่ซึ่งยังไม่มีรายงานมาก่อนคือ *chpA, A1, B, B1* ซึ่งเกี่ยวข้องกับเมตาบอลิซึมของ CPF และพิสูจน์ได้ว่า มีโปรตีน *ChpR* ที่ควบคุมการแสดงออกของยีน *chpA1* ด้วย

Abstract

1. Genetic study of the pesticide-targeted enzyme

4-Hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (HPPD), encoded by *hpdA*. HPPD is a specific target of the pesticide, isoxaflutole, and is also an essential enzyme in tyrosine metabolism. In the soil bacterium, *Sinorhizobium meliloti*, a divergently transcribed ORF upstream of *hpdA*, designated *hpdR*, was found to be a positive regulator of *hpdA*. Disruption of either *hpdA* or *hpdR* caused an accumulation of the HPPD substrate, hydroxyphenylpyruvate (HPP). Pesticides belonging to the group that includes isoxaflutole apparently inhibit HPPD enzyme activity. Molecular analysis of the intergenic region between *hpdR* and *hpdA* revealed two copies of a direct repeat sequence S1 and S2 that were proposed to be HpdR-binding sites. DnaseI footprinting demonstrated that HpdR indeed binds to the region spanning S1 and S2. Upon exposure to the HPP, HpdR undergoes a conformational change that leads to the activation of *hpdA* transcription.

2. Discovery of the novel genes: *chpR*, *chpA*, *chpA1*, *chpB* and *chpB1* for biosensor development

Screening of a Transposon Random Integration β -galactosidase fusion library for isolates that show induction of *lacZ* in response to pesticide exposure resulted in the discovery of the *chpR-chpA-chpA1* locus on the endogenous plasmid pSymB. Transcription of *chpA-chpA1* was highly induced upon exposure to the insecticide, Chlorpyrifos (CPF). The inducibility of *chpA1* is ChpR dependent suggesting that ChpR is a positive transcriptional activator. *S. meliloti* strains that over-produced ChpRAA1 became CPF sensitive. Moreover, a pair of similar genes, named *chpB* and *chpB1*, was found 232 kbp away on the same plasmid. ChpAB and ChpA1B1 protein sequences share a high degree of identity at 50 and 68%, respectively. Over-expression of *chpB* and *chpB1* causes cells to become more resistant to CPF and this phenotype is ChpR, ChpA and ChpA1 dependent suggesting that ChpA1 converts CPF to a more toxic metabolite which is then further detoxified by ChpBB1.