

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ RMU5080062

ชื่อโครงการ การศึกษาโครงสร้างและหน้าที่ของโปรตีนสารพิษฆ่าลูกน้ำจากแบคทีเรีย

Bacillus sphaericus

ชื่อนักวิจัย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ปนัดดา บุญเสริม

สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล

E-mail Address mbpbs@mahidol.ac.th

ระยะเวลาโครงการ 3 ปี

แบคทีเรีย *Bacillus sphaericus* สร้างโปรตีน binary toxin ที่ประกอบด้วยโปรตีน BinA และ BinB ที่มีขนาด 42 และ 51 กิโลดาลตันตามลำดับ โปรตีนทั้งสองนี้ต้องทำงานร่วมกันในการออกฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำ โดย BinB ทำหน้าที่จับกับตัวรับจำเพาะบนเยื่อหุ้มเซลล์ และ BinA ทำหน้าที่ทำลายเซลล์ ในงานวิจัยนี้ได้ทำการวิเคราะห์หาชิ้นส่วนของ BinA ที่ทำหน้าที่จับกับ BinB โดยทำการโคลนยีนสำหรับสร้างชิ้นส่วนต่างๆ ของ BinA ทั้งด้านปลายอะมิโนและปลายคาร์บอกซีใน *E. coli* เมื่อทดสอบการฆ่าลูกน้ำของสายพันธุ์ *Culex quinquefasciatus* พบว่าชิ้นส่วนของ BinA ทั้งชิ้นส่วนเดียวและเมื่อนำมาผสมกันนั้นไม่มีคุณสมบัติในการฆ่าลูกน้ำ และจากการวิเคราะห์การจับกับ BinB พบว่าชิ้นส่วนย่อยทางด้านปลายคาร์บอกซีนั้นทำหน้าที่จับกับ BinB นอกจากนี้จากการศึกษาในลักษณะเดียวกันในโปรตีน BinB พบว่าโปรตีนชิ้นส่วนย่อยของ BinB ทุกชิ้นส่วนสามารถจับกับตัวรับบนผิวเซลล์กระเพาะลูกน้ำ และชิ้นส่วนเหล่านี้สามารถจับกับ BinA ได้ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าโปรตีน BinB นั้นอาศัยกรดอะมิโนหลายๆตำแหน่งทั้งด้านปลายอะมิโนและปลายคาร์บอกซีในการจับกับโปรตีน BinA และจับกับตัวรับบนผิวเซลล์กระเพาะลูกน้ำ และทั้งโมเลกุลนั้นมีความสำคัญในการออกฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำ นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษาบทบาทของกรดอะมิโนชนิดประจำต่อการทำงานของ BinA พบว่าเมื่อแทนที่กรดอะมิโนตำแหน่ง R97 E98 R101 และ E114 นั้นด้วยกรดอะมิโน Alanine แล้วไม่มีผลกระทบต่อโครงสร้างสามมิติโดยรวมของโปรตีน และการจับกับ BinB แต่กรดอะมิโนเหล่านี้มีความสำคัญต่อการออกฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำ ซึ่งอาจมีบทบาทต่อกลไกการเข้าสู่เซลล์หรือการทำลายเซลล์ของ BinA และจากการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนในบางตำแหน่งของ BinB เพื่อศึกษาบทบาทของกรดอะมิโนเหล่านั้นในการฆ่าลูกน้ำ และการจับกับตัวรับบนผิวเซลล์กระเพาะลูกน้ำ พบว่ากรดอะมิโนตำแหน่ง F149 และ Y150 นั้นมีบทบาทที่สำคัญต่อกลไกการออกฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำ โดยมีความสำคัญต่อกลไกการจับกับเยื่อหุ้มเซลล์และตัวรับบนผิวเซลล์กระเพาะลูกน้ำ

Abstract

Project Code: RMU5080062

Project Title: Structure and Function of the Binary Toxin, a Mosquito-larvicidal agent of
Bacillus sphaericus

Investigator: Assistant Professor Panadda Boonserm

Institute of Molecular Biosciences, Mahidol University

E-mail Address: mbpbs@mahidol.ac.th

Project Period: 3 years

The binary toxin, produced from *Bacillus sphaericus*, consists of two components, BinA (42 kDa) and BinB (51 kDa), and both are required at equimolar amounts to exert maximal biological activity. It has been known that BinB serves as the specificity determinant subunit by binding to the specific receptor on the epithelium gut cell membrane whereas BinA is required for the toxic action. To identify the functional regions of BinA involved in the interaction with its BinB partner, four truncated fragments, from both N- and C-terminal parts, of BinA were successfully constructed and expressed in *E. coli* cells. No toxicity against *Culex quinquefasciatus* larvae was observed when these fragments were fed either alone or as a mixture with BinB. The *in vitro* binding assay showed strong binding of both C-terminal fragments to BinB protein suggesting that the C-terminal domain plays an important role for the BinA-BinB interaction. Furthermore, an analogous study with BinB protein has been done in search of the regions required for the interaction with BinA and receptor. Immunohistochemistry analyses demonstrate that all truncated BinB constructs are able to bind to the epithelium gut cell membrane, and *in vitro* protein-protein interaction assays revealed that these constructs can bind to BinA. These results show that fragments corresponding to both halves of BinB are able to bind the receptor and to interact with BinA, but both halves are required by the toxin to exhibit full larvicidal activity. Site-directed mutagenesis at selected charged amino acids of BinA was performed and results demonstrated that R97, E98, R101 and E114 neither play a direct role to maintain BinA structure nor involve with BinA-BinB interaction. Since these residues are required for full activity, they may play an important role during toxin internalization and/or toxic action of BinA inside the target cells. Also site-directed mutagenesis of BinB was performed to pin point the critical amino acids for the larvicidal activity and receptor recognition. Results showed that the aromaticity of F149 and Y150 is a key determinant of larvicidal activity, possibly playing a key role in the membrane interaction and receptor binding.