

Project Code: RSA5380003

Project Title: Membrane pore formation by a cytolytic toxin from *Bacillus thuringiensis*

Investigator: Boonhiang Promdonkoy

E-mail Address: boonhiang@biotec.or.th

Project Period: 31 May 2010 – 30 May 2013

Abstract

Cyt toxin is a parasporal crystal protein produced by some strains of *Bacillus thuringiensis* (Bt). This protein is toxic to mosquito larvae and synergizes activity of Bt Cry toxins. The drawback of this toxin is its non-specific cytolytic activity to broad range of cells. To make the toxin more specific, molecular mechanism in which the toxin damage the target cell has been investigated. Protein solubilization, protease activation and binding to phospholipid components of cell membrane were studied. It was found that Cyt toxin molecules form large complexes on cell membrane prior to induce cell lysis. The active complex is formed after accumulation of the toxin molecules until reaching a critical number. However, we are unable to determine the precise number of the toxin molecule in the active complex. Structure-function relationship investigation revealed that amino acids in αA , αC & αD - $\beta 4$ loop play important role during membrane binding and amino acids in αD - $\beta 4$ & $\beta 6$ - $\beta 7$ loops are responsible for selectivity of the toxin. Based on this knowledge we are able to produce mutant toxins that are highly specific to mosquito larvae without non-specific cytolytic activity such as T148K and T148Q mutants. In addition, mutant toxins with higher mosquito larvicidal activity than the wild type were generated e.g. S194A, Q200A and F204A. The *cyt* toxin gene was also transformed into *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* IPS82 (Bti IPS82), a strain recommended by WHO to use as a mosquito control agent. Interestingly, the transformant shows up to 6 folds higher toxicity than that of the wild type. This recombinant strain would be a good choice to be applied to control *Aedes* mosquito, a major vector for dengue fever. We have demonstrated that Cyt toxin is active against Lepidopteran larvae such as *Spodoptera exigua*. It is therefore possible to develop this toxin as an effective biocontrol agent to be used in combination with other insecticidal proteins to avoid insect resistant development in the future.

บทคัดย่อ

โปรตีน Cyt toxin ที่สร้างจากแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* บางสายพันธุ์ เป็นโปรตีนที่ออกฤทธิ์ต่อลูกน้ำยุงและสามารถเสริมฤทธิ์กับโปรตีนอื่นๆ ให้สามารถออกฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงได้ดีขึ้นอย่างมาก อย่างไรก็ตามโปรตีนชนิดนี้สามารถออกฤทธิ์ต่อเซลล์อื่นๆ ได้ด้วย เพื่อที่จะพัฒนาโปรตีนให้มีความจำเพาะและออกฤทธิ์ได้ดียิ่งขึ้น จึงได้ทำการศึกษากลไกการทำลายเซลล์ของโปรตีนชนิดนี้ เริ่มตั้งแต่การละลายของผลึกโปรตีน การกระตุ้นด้วยเอนไซม์ Protease การเข้าจับกับหมู่ไขมัน (phospholipids) ที่เป็นองค์ประกอบหลักของเยื่อหุ้มเซลล์ การรวมตัวกันเพื่อเป็นโครงสร้างขนาดใหญ่บนเยื่อหุ้มเซลล์จนนำไปสู่การออกฤทธิ์ทำลายเซลล์และทำให้เซลล์ตายในที่สุด การออกฤทธิ์ผ่านกลไกต่างๆ เหล่านี้ต้องอาศัยการทำงานร่วมกันของโปรตีนหลายโมเลกุลจนเกิดเป็นโครงสร้างขนาดใหญ่มากจนไม่สามารถวิเคราะห์หาจำนวนโมเลกุลที่ชัดเจนได้ ผลการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและการทำหน้าที่พบว่ากรดอะมิโนที่อยู่ใน เกลียวอัลฟาเอ อัลฟาซี และบริเวณลูปอัลฟาดี-เบต้าสี่ (αA , αC & αD - $\beta 4$ loop) มีบทบาทสำคัญต่อการจับกับเยื่อหุ้มเซลล์ ส่วนกรดอะมิโนที่อยู่บริเวณลูป อัลฟาดี-เบต้าสี่ และเบต้าหก-เบต้าเจ็ด (αD - $\beta 4$ & $\beta 6$ - $\beta 7$ loops) มีหน้าที่กำหนดความจำเพาะในการออกฤทธิ์ต่อเซลล์เป้าหมาย อาศัยความรู้ต่างๆ ที่ได้ในครั้งนี เราสามารถสร้างโปรตีนที่ออกฤทธิ์อย่างจำเพาะต่อลูกน้ำยุงและลด non-specific cytolytic activity ต่อเซลล์ชนิดอื่นๆ ได้โดยทำการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนในบริเวณนี้ เช่นการแทนที่กรดอะมิโนที่ตำแหน่ง Thr-148 (T148K and T148Q) ทำให้ได้โปรตีนที่ออกฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงได้ดีมาก และมีความจำเพาะสูงโดยไม่มีฤทธิ์ต่อเซลล์อย่างอื่นเลย นอกจากนี้เรายังสามารถสร้างโปรตีนที่ออกฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงได้ดีกว่าโปรตีนต้นแบบ เช่น โปรตีนกลายพันธุ์ S194A, Q200A และ F204A เป็นต้น เมื่อทำการถ่ายยีน cyt toxin เข้าสู่แบคทีเรีย *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* IPS82 (Bti IPS82) ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่องค์การอนามัยโลกแนะนำสำหรับใช้ควบคุมลูกน้ำยุง พบว่าได้แบคทีเรียที่ออกฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงได้ดีกว่าเดิมถึง 6 เท่า ดังนั้นจึงควรนำแบคทีเรียที่ได้นี้ไปใช้ในการควบคุมลูกน้ำยุงลายที่กำลังเป็นปัญหาอยู่ในปัจจุบัน โปรตีน Cyt toxin สามารถนำมาใช้ในการกำจัดแมลงศัตรูพืชจำพวกหอนผีเสื้อเช่นหอนกระทุหมได้ แต่ต้องทำให้อยู่ในรูปที่ละลายแล้วจึงจะให้ผลดี ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่จะพัฒนาโปรตีนชนิดนี้เพื่อใช้ร่วมกับโปรตีนกำจัดหอนแมลงศัตรูพืช เพื่อให้ได้เป็นผลิตภัณฑ์ที่ออกฤทธิ์ได้ดี และหลีกเลี่ยงการดื้อของแมลงในอนาคต

คำหลัก : *Bacillus thuringiensis*, Cytolytic toxin, membrane binding, oligomerization, pore formation, protein structure