บทที่ 2

ผลงานวิจัยและงานเขียนอื่น ๆที่เกี่ยวข้อง

2.1 แบคทีเรีย *Bacillus sphaericus* และ โปรตีนสารพิษจาก *Bacillus sphaericus*

2.1.1 ข้อมูลทั่วไปเกี่ยวกับแบคทีเรีย *Bacillus sphaericus*

แบคทีเรีย *Bacillus sphaericus* (Bs) เป็นแบคทีเรียแกรมบวก (Gram positive) ที่มีการดำรงชีวิตแบบอาศัยออกซิเจน ซึ่งสามารถพบได้ทั่วไปตามพื้นดินและแหล่งน้ำต่างๆ แบคทีเรียที่ถูกจัดจำแนกอยู่ในกลุ่มนี้จะมีลักษณะพื้นฐานที่สำคัญคือ มีการสร้างสปอร์ที่มีรูปร่างค่อนข้างกลม นอกจากนี้ยังมีการศึกษาพบว่าบางสายพันธุ์ของแบคทีเรียกลุ่มนี้มีความสามารถในการแสดงความเป็นพิษต่อลูกน้ำยุง ซึ่งลักษณะดังกล่าวมีความเกี่ยวข้องกับการที่แบคทีเรียมีการผลิตโปรตีนสารพิษที่มีความสามารถในการออกฤทธิ์ต่อลูกน้ำยุง

หลักเกณฑ์การจัดจำแนกหลากหลายวิธีถูกนำมาใช้ในการจัดจำแนกแบคทีเรียกลุ่มนี้ ตัวอย่างเช่น การจัดจำแนกแบคทีเรีย *B. sphaericus* โดยอาศัยหลักเกณฑ์ของความคล้ายคลึงของดีเอ็นเอ (DNA Homology) ซึ่งจะสามารถจำแนกแบคทีเรีย *B. sphaericus* เป็น 5 กลุ่ม (DNA homology groups I, II, III, IV และ V) โดยกลุ่มที่สอง (DNA homology groups II) ได้ถูกจำแนกเป็นกลุ่มย่อย ซึ่งสามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่ม IIA ซึ่งเป็นกลุ่มของแบคทีเรีย *B. sphaericus* ที่มีความคล้ายคลึงของดีเอ็นเอมากกว่า 79% โดยจะประกอบด้วยสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการผลิตโปรตีนสารพิษที่มีฤทธิ์ต่อลูกน้ำยุง และ กลุ่ม IIB ซึ่งเป็นกลุ่มของแบคทีเรีย *B. sphaericus* สายพันธุ์ที่ไม่มีการแสดงความเป็นพิษ โดยแบคทีเรียทั้งสองกลุ่มจะมีค่าความคล้ายคลึงของดีเอ็นเออยู่ระหว่าง 57-66% (Baumann et al , 1991; Aquino De Muro et al., 1992; Charles et al., 1996)

นอกจากนี้แบคทีเรีย *B. sphaericus* สายพันธุ์ที่มีการแสดงความเป็นพิษยังสามารถจัดจำแนกตามประสิทธิภาพของโปรตีนพิษในการออกฤทธิ์ต่อลูกน้ำยุง โดยสามารถจำแนกออกเป็น 2 กลุ่ม คือ แบคทีเรีย *B. sphaericus* สายพันธุ์ที่ผลิตโปรตีนสารพิษที่มีความเป็นพิษสูง (High toxicity strains (LC_{50}~10^2-10^3 cells/ml)) (Thanabalu and Porter, 1996) เช่น แบคทีเรีย *B. sphaericus* สายพันธุ์ 2362 2297 และ IAB59 เป็นต้น และ สายพันธุ์ที่ผลิตโปรตีนสารพิษที่มีความเป็นพิษต่ำ (Low toxicity strains (LC_{50}~10^5 cells/ml)) เช่น แบคทีเรีย *B. sphaericus* สายพันธุ์ KellenQ SSII-1 และ 31-2 เป็นต้น

2.1.2 โปรตีนสารพิษจากแบคทีเรีย *Bacillus sphaericus*

2.1.2.1 โปรตีนสารพิษ Binary toxin

โปรตีนสารพิษ Binary toxin ประกอบด้วยโปรตีน 2 ชนิด คือ โปรตีน BinA และโปรตีน BinB ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีขนาด 42 และ 51 kDa ตามลำดับ โปรตีนทั้งสองชนิดจะถูกสร้างในปริมาณเท่ากันและมีการจัดเรียงโมเลกุลให้อยู่ในโครงสร้างที่เป็นผลึกของโปรตีน ซึ่งจะสามารถสังเกตเห็นได้เมื่อแบคทีเรีย *B. sphaericus* เข้าสู่ระยะที่ 3 ของระยะที่มีการสร้างสปอร์ (Charles et al., 1996) เมื่อสปอร์ของแบคทีเรียถูกกินโดยลูกน้ำยุง โปรตีน Binary toxin ซึ่งถูกสร้างให้อยู่ในโครงสร้างที่ยังไม่สามารถทำงานได้ จะถูกละลายภายในกระเพาะลูกน้ำยุงที่มีสภาวะเป็นด่าง จากนั้นเอนไซม์ย่อยโปรตีนภายในกระเพาะลูกน้ำยุงจะทำการย่อยโปรตีน BinA และโปรตีน BinB ผลจากการถูกย่อยด้วยเอนไซม์ดังกล่าวจะทำให้โปรตีนทั้งสองชนิดมีขนาดเล็กลง กล่าวคือ โปรตีน BinA และ โปรตีน BinB ภายหลังจากการถูกย่อยด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีนภายในกระเพาะลูกน้ำยุงจะมีขนาดประมาณ 39 และ 43 kDa ตามลำดับ ซึ่งจะอยู่ในโครงสร้างที่พร้อมจะแสดงความเป็นพิษ (Baumann, 1991; Charles et al., 1996)

จากการศึกษาการทำหน้าที่ของโปรตีน BinA และ โปรตีน BinB แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่าการแสดงความเป็นพิษของโปรตีน BinA เพียงชนิดเดียวสามารถออกฤทธิ์ต่อลูกน้ำยุงได้ ถึงแม้ความเป็นพิษที่แสดงออกจะอยู่ในระดับต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับการแสดงความเป็นพิษของผลึกโปรตีน Binary toxin ซึ่งภายในประกอบด้วยโปรตีน BinA และ โปรตีน BinB ในขณะที่การศึกษาการแสดงออกของโปรตีน BinB เพียงชนิดเดียวพบว่าไม่สามารถแสดงความเป็นพิษต่อลูกน้ำยุงได้ ดังนั้นจากการศึกษาดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า การมีอยู่ของโปรตีน BinA และ โปรตีน BinB มีความจำเป็นต่อการแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าโปรตีนทั้งสองชนิดนี้มีการทำหน้าที่ร่วมกันในการออกฤทธิ์ต่อลูกน้ำยุง (Baumann, 1991) ซึ่งได้มีการศึกษาในภายหลังพบว่า โปรตีน BinB น่าจะทำหน้าที่ในการจับกับโปรตีนตัวรับที่จำเพาะที่มีอยู่บนเซลล์กระเพาะลูกน้ำยุง ในขณะที่โปรตีน BinA ทำหน้าที่เกี่ยวกับการแสดงความเป็นพิษ (Silva-Filha et al., 1999)

2.1.2.2 โปรตีนสารพิษในกลุ่ม Mosquitocidal toxins (Mtxs)

โปรตีนสารพิษในกลุ่ม Mosquitocidal toxins (Mtxs) ประกอบด้วยโปรตีน 3 ชนิด คือ โปรตีน Mtx1 โปรตีน Mtx2 และ โปรตีน Mtx3 (Thanabalu et al., 1991; Thanabalu and Porter, 1996; Liu et al., 1996) โปรตีนแต่ละชนิดในกลุ่มนี้สามารถแสดงความเป็นพิษต่อลูกน้ำยุงได้โดยลำพังโดยไม่ต้องอาศัยการทำหน้าที่ร่วมกันอย่างเช่นโปรตีน Binary toxin และจะถูกทำลายอย่างสมบูรณ์เมื่อแบคทีเรีย *B. sphaericus* เข้าสู่ระยะที่มีการสร้างสปอร์

โปรตีน Mtx1 เป็นโปรตีนในกลุ่ม Mtxs ที่ได้รับความสนใจและมีการศึกษามากที่สุด โดยแบคทีเรีย *B. sphaericus* จะสังเคราะห์โปรตีน Mtx1 ที่มีขนาด 100 kDa (Thanabalu et al., 1991) ซึ่งประกอบด้วยโครงสร้างของโปรตีน 2 ส่วน คือ โครงสร้างด้านปลาย N-terminus และ C-terminus ที่มีขนาด 27 และ 70 kDa ตามลำดับ โปรตีน Mtx1 เป็นโปรตีนสายเดี่ยวที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวน 870 กรดอะมิโน กรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบดังกล่าวประกอบด้วยลำดับกรดอะมิโนสัญญาณ (putative signal sequence) (กรดอะมิโนลำดับที่ 1-29) ลำดับกรดอะมิโนที่เป็นส่วนประกอบของโครงสร้างที่ทำหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยา (catalytic domain) (กรดอะมิโนลำดับที่ 30-264) ลำดับกรดอะมิโนบริเวณตัวเชื่อม (linker) (กรดอะมิโนลำดับที่ 265-295) และลำดับกรดอะมิโนอื่นๆ จำนวน 575 กรดอะมิโน (Treiber et al., 2008) จากการศึกษาพบว่าโครงสร้างบริเวณที่ทำหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยาของโปรตีน Mtx1 ซึ่งเป็นโครงสร้างทางด้านปลาย N-terminus มีความสามารถในการเกิดปฏิกิริยา ADP-ribosylation ซึ่งเป็นปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของโปรตีน (protein modification) โดยการถ่ายโอนหมู่ ADP-ribose ไปยังกรดอะมิโนตัวรับ (acceptor) ที่เป็นองค์ประกอบของโปรตีน โดยในกรณีของโปรตีน Mtx1 สามารถเกิดปฏิกิริยา ADP-ribosylation กับกรดอะมิโนอาร์จินีน (Arginine) ที่เป็นองค์ประกอบของโปรตีนได้หลายชนิด (Thanabalu et al., 1993; Treiber et al., 2008) นอกจากนี้ยังพบว่าโครงสร้างที่ทำหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยาของโปรตีน Mtx1 มีความคล้ายคลึงกับโครงสร้างที่ทำหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยาของโปรตีนสารพิษชนิดอื่นๆ เช่น โปรตีนสารพิษ Cholera toxin จากแบคทีเรีย *Vibrio cholerae* โปรตีนสารพิษ Pertussis toxin (S1 subunit) จากแบคทีเรีย *Bordetella pertussis* และ โปรตีนสารพิษ Heat-labile toxin จากแบคทีเรีย *Escherichia coli* (Thanabalu et al., 1991) รวมถึงเอนไซม์ที่มี ADP-ribosylase activity ตัวอย่างเช่น เอนไซม์ Poly(ADP-ribosyl) polymerase (PARP) เป็นต้น (Treiber et al., 2008) ในขณะที่มีการศึกษาพบว่าโครงสร้างด้านปลาย C-terminus มีความคล้ายคลึงกับโปรตีน Ricin B ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีโครงสร้างที่ทำหน้าที่ในการจับกับโมเลกุลของคาร์โบไฮเดรตหรือหมู่น้ำตาล (Treiber et al., 2008)

โปรตีน Mtx2 เป็นโปรตีนสารพิษจากแบคทีเรีย *B. sphaericus* ที่มีขนาดเล็กที่สุด โดยแบคทีเรีย *B. sphaericus* จะสังเคราะห์โปรตีน Mtx2 ขนาด 31.8 kDa ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวน 292 กรดอะมิโน (Thanabalu and Porter, 1996) จากการศึกษาเปรียบเทียบโครงสร้างและลำดับกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของโปรตีน Mtx2 กับโปรตีนที่มีอยู่ภายในฐานข้อมูลพบว่า กรดอะมิโนบางตำแหน่งของโปรตีน Mtx2 มีความคล้ายคลึงกับกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของโปรตีนสารพิษ Epsilon toxin จากแบคทีเรีย *Clostridium perfringens* และ

โปรตีนสารพิษ Aerolysin จากแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีขนาด 33 และ 31.68 kDa ตามลำดับ (Thanabalu and Porter, 1996) นอกจากนี้จากที่ได้มีการศึกษาพบว่าโปรตีนสารพิษ Epsilon toxin และ Aerolysin เป็นโปรตีนที่มีความสามารถในการก่อให้เกิดรูรั่วบนเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่เป็นเซลล์เป้าหมาย ส่งผลให้น้ำซึ่งเป็นสิ่งแวดล้อมภายนอกเซลล์ไหลเข้าสู่เซลล์ ซึ่งจะทำให้เซลล์สูญเสียสมดุลและตายในที่สุด อย่างไรก็ตามถึงแม้ว่าโปรตีนสารพิษ Mtx2 จะเป็นโปรตีนที่มีความสามารถในการออกฤทธิ์ต่อลูกน้ำยุงซึ่งเป็นเซลล์เป้าหมายที่ต่างชนิดออกไป แต่จากการที่กรดอะมิโนบางตำแหน่งของโปรตีน Mtx2 มีความคล้ายคลึง (homology) กับกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของโปรตีนสารพิษ ε-toxin (Epsilon toxin) และโปรตีนสารพิษ Aerolysin ได้แสดงให้เห็นว่าโปรตีน Mtx2 อาจมีกลไกในการออกฤทธิ์ต่อเซลล์เป้าหมายที่เป็นไปในลักษณะเดียวกันกับกลไกในการแสดงความเป็นพิษของโปรตีนสารพิษทั้งสองชนิดดังกล่าว

โปรตีน Mtx3 เป็นโปรตีนสารพิษอีกชนิดหนึ่งในกลุ่ม Mtxs แบคทีเรีย *B. sphaericus* จะทำการสังเคราะห์โปรตีน Mtx3 ที่มีขนาด 35.8 kDa ซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวน 326 กรดอะมิโน (Liu et al., 1996) โดยได้มีการศึกษาพบว่าโครงสร้างและลำดับกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของโปรตีน Mtx3 มีความคล้ายคลึงกับโปรตีนสารพิษ Mtx2 ซึ่งเป็นโปรตีนสารพิษในกลุ่มเดียวกัน อีกทั้งยังพบความคล้ายคลึงระหว่างโปรตีน Mtx3 กับโปรตีนสารพิษ ε-toxin จากแบคทีเรีย *Clostridium perfringens* และโปรตีนสารพิษ Aerolysin จากแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* ด้วยเช่นกัน

2.1.2.3 **โปรตีนสารพิษ** Sphaericolysin

ถึงแม้ว่าผลจากการศึกษาเกี่ยวกับการจัดจำแนกแบคทีเรีย *B. sphaericus* โดยอาศัยความคล้ายคลึงของดีเอ็นเอ (DNA Homology) เป็นเกณฑ์ จะพบว่าแบคทีเรีย *B. sphaericus* ในกลุ่ม IIA ซึ่งเป็นกลุ่มของแบคทีเรีย *B. sphaericus* ที่มีความคล้ายคลึงของดีเอ็นเอมากกว่า 79% จะประกอบด้วยสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการผลิตโปรตีนสารพิษที่มีฤทธิ์ต่อลูกน้ำยุง (Baumann et al., 1991; Charles et al., 1996) แบคทีเรีย *B. sphaericus* สายพันธุ์ A3-2 เป็นสายพันธุ์หนึ่งที่ถูกจัดจำแนกอยู่ในกลุ่ม IIA อย่างไรก็ตามแบคทีเรียชนิดนี้ไม่มีความสามารถในการผลิตโปรตีนสารพิษที่มีฤทธิ์ในการฆ่าลูกน้ำยุง ซึ่งเป็นผลจากการขาดยีนที่ทำหน้าที่ในการสังเคราะห์โปรตีนสารพิษที่มีฤทธิ์ต่อลูกน้ำยุง ในทางตรงข้ามแบคทีเรีย *B. sphaericus* สายพันธุ์ A3-2 กลับมีความสามารถในการผลิตโปรตีนสารพิษที่มีฤทธิ์ต่อระบบ

ประสาทของแมลงจำพวกแมลงสาบ (*Blattela germanica*) และ หนอน (*Spodoptera litura*) โปรตีนสารพิษดังกล่าวคือ โปรตีนสารพิษ Sphaericolysin (Nishiwaki et al., 2007)

โปรตีนสารพิษ Sphaericolysin เป็นโปรตีนขนาด 53 kDa ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวน 478 กรดอะมิโน จากการศึกษาเกี่ยวกับความสามารถในการแสดงความเป็นพิษของโปรตีนสารพิษ Sphaericolysin พบว่าโปรตีนสารพิษชนิดนี้มีฤทธิ์ในการทำลายระบบประสาทของสิ่งมีชีวิตเป้าหมาย โดยโปรตีนสารพิษจะมีผลทำให้เซลล์ประสาทถูกแยกออกจากปมประสาท จากนั้นเซลล์ประสาทจะถูกทำลายอย่างรวดเร็ว นอกจากนี้ยังพบว่าโปรตีนสารพิษชนิดนี้ยังมีความสามารถในการทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงแตกเมื่อนำมาทดสอบกับเซลล์เม็ดเลือดแดงของหนู (wistar rat) อีกด้วย ซึ่งแสดงให้เห็นถึงลักษณะของโปรตีนสารพิษที่มีความสามารถก่อให้เกิดรูรั่วบนเซลล์เป้าหมาย (pore-forming toxin) อย่างไรก็ตามโปรตีนสารพิษ Sphaericolysin เป็นโปรตีนที่ถูกค้นพบได้ไม่นาน ดังนั้นหากมีการศึกษาเกี่ยวกับโปรตีนชนิดนี้มากขึ้น โปรตีนสารพิษ Sphaericolysin อาจเป็นทางเลือกหนึ่งที่จะถูกนำมาใช้ในฐานะ “สารควบคุมทางชีวภาพ” ที่มีประสิทธิภาพเช่นเดียวกับโปรตีนสารพิษอื่นๆได้ในอนาคต

2.2 โปรตีนสารพิษจากแบคทีเรียชนิดอื่น ๆที่มีความคล้ายคลึงกับโปรตีนสารพิษ Mtx2

2.2.1 โปรตีนสารพิษ Aerolysin จากแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila*

แบคทีเรียในสกุล *Aeromonas* spp. เป็นแบคทีเรียแกรมลบ (Gram negative) ที่สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจนและไร้ออกซิเจน สามารถพบได้ทั่วไปตามพื้นดินและแหล่งน้ำต่างๆ โดยจะพบมากบริเวณพื้นที่ที่มีสภาพอากาศอบอุ่น แบคทีเรียกลุ่มนี้เป็นแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตโปรตีนสารพิษ Aerolysin ที่สามารถแสดงความเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตหลายชนิด เช่น สิ่งมีชีวิตในกลุ่มสัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ (amphibians) สัตว์เลื้อยคลาน (reptiles) ปลา รวมถึงมนุษย์ การแสดงความเป็นพิษของแบคทีเรียกลุ่มนี้ในมนุษย์มีความเกี่ยวข้องกับการเป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อหลายชนิด ตัวอย่างเช่น ภาวการณ์ติดเชื้อบริเวณที่เป็นบาดแผล ภาวการณ์ติดเชื้อในเนื้อเยื่อหรือกระแสโลหิต หรือภาวะโลหิตเป็นพิษ รวมทั้งอาการของโรคที่เกิดจากการปนเปื้อนของแบคทีเรียตามแหล่งน้ำและการปนเปื้อนในอาหาร เช่น การเกิดภาวะกระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบ เป็นต้น (Kirov, 1997; Janda and Abbott, 1998)

โปรตีนสารพิษ Aerolysin จากแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* เป็นโปรตีนสารพิษ Aerolysin ชนิดแรกที่ถูกค้นพบในบรรดาแบคทีเรียในสกุล *Aeromonas* spp. ทั้งหมด แบคทีเรีย *Ae. hydrophila* จะทำการสังเคราะห์โปรตีนสารพิษ Aerolysin ที่มีขนาด 52 kDa ใน

โครงสร้างที่ละลายได้ (soluble protein) และยังไม่สามารถแสดงความเป็นพิษ (proaerolysin) โครงสร้างของโปรตีน Proaerolysin จะประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวน 470 กรดอะมิโน โดยโครงสร้างจะมีลักษณะคล้ายตัวอักษร “L” ดังแสดงในภาพที่ 3

ภาพที่ 3

โครงสร้างสามมิติของโปรตีน Aerolysin

โครงสร้างสามมิติแบบริบบิ้น (Ribbon structure) ของโปรตีน Aerolysin จากแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* โดย I II III และ IV แสดงโดเมนที่ 1 โดเมนที่ 2 โดเมนที่ 3 และโดเมนที่ 4 ตามลำดับ

ที่มา : Parker et al., 1994

โครงสร้างของโปรตีน Aerolysin สามารถแบ่งออกเป็นโครงสร้างหลัก 4 ส่วนคือ โดเมนที่ 1 ซึ่งทำหน้าที่สำคัญเกี่ยวข้องกับการจับกับโปรตีนตัวรับที่จำเพาะและการเกิดปฏิกิริยาการจับกันของโปรตีน Proaerolysin จำนวน 2 โมเลกุล (dimerization) โดเมนที่ 2 ซึ่งมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการจับกับโปรตีนตัวรับเช่นเดียวกับโดเมนที่ 1 นอกจากนี้ยังมีหน้าที่สำคัญในการเกิดปฏิกิริยาการจับกันระหว่างโปรตีน Proaerolysin หลายโมเลกุล (oligomerization) โดเมนที่ 3 จะมีหน้าที่เกี่ยวกับการเกิดปฏิกิริยาระหว่างโปรตีน Proaerolysin โมเลกุลเดี่ยว (monomer)

ภายในกลุ่มของโปรตีน Proaerolysin (oligomer) ในขณะที่โดเมนที่ 4 เป็นโครงสร้างที่มีโครงสร้างบางส่วนถูกตัดออกไปภายหลังจากการเกิดปฏิกิริยาการถูกย่อยด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีน ซึ่งเป็นการกระตุ้นและเปลี่ยนแปลงให้โครงสร้างของโปรตีน Proaerolysin ที่ยังไม่สามารถทำงานให้อยู่ในโครงสร้างที่สามารถแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์เป้าหมายได้ (active หรือ mature aerolysin)

ภายหลังจากที่แบคทีเรีย *Ae. hydrophila* สังเคราะห์โปรตีนสารพิษ Aerolysin ที่อยู่ในโครงสร้างที่เป็น Proaerolysin และหลั่งออกสู่ภายนอกเซลล์ Proaerolysin จะเข้าจับกับโปรตีนตัวรับที่จำเพาะที่มีอยู่บนเซลล์เป้าหมายจากการทำหน้าที่ของโครงสร้างในโดเมนที่ 1 และ โดเมนที่ 2 จากนั้น Proaerolysin จะถูกย่อยโดยเอนไซม์ย่อยโปรตีนภายในเซลล์เป้าหมาย ทำให้โครงสร้างทางด้านปลาย C-terminus ถูกตัดออกไป (Abrami et al., 2000) จากปฏิกิริยาดังกล่าวส่งผลให้มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ Proaerolysin เกิดเป็นโครงสร้างที่สามารถแสดงความเป็นพิษได้ (active หรือ mature aerolysin) จากนั้นโมเลกุลโปรตีนสารพิษ Aerolysin จะมีการจับกันเป็นกลุ่ม (oligomerization) บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์เป้าหมาย ส่งผลให้บริเวณที่มีการจับกันของโปรตีน Aerolysin นั้นมีความเข้มข้นของโปรตีนสารพิษดังกล่าวเพิ่มมากขึ้น (Abrami and van der Goot, 1999) ซึ่งจะช่วยส่งเสริมให้แต่ละโมเลกุลของโปรตีนสารพิษ Aerolysin ใช้โครงสร้างในโดเมนที่ 3 ของแต่ละโมเลกุลจับกันและเกิดการจัดเรียงเป็นโครงสร้างที่มีลักษณะคล้ายวงแหวนซึ่งมีความเสถียร ที่ประกอบด้วยโมเลกุลโปรตีนสารพิษ Aerolysin จำนวน 7 โมเลกุล (heptameric complex) หลังจากนั้นโครงสร้างส่วนที่เป็น β-sheet ในโดเมนที่ 3 ของโปรตีนสารพิษ Aerolysin แต่ละโมเลกุลภายในโครงสร้างดังกล่าวจะทำการแทรกตัวเข้าไปภายในเยื่อหุ้มของเซลล์เป้าหมาย ทำให้เยื่อหุ้มบริเวณนั้นเกิดเป็นช่องหรือรูรั่ว (Abrami et al., 2000) ที่มีลักษณะเป็น β-barrel pore ซึ่งส่งผลให้มีไอออนไหลออกสู่ภายนอกเซลล์ ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์บริเวณนั้นเกิดการเสียสมดุลและทำให้เซลล์ตายในที่สุด (Abrami et al., 2000)

จากการศึกษาเกี่ยวกับโปรตีนสารพิษ Aerolysin พบว่าโปรตีนสารพิษ Aerolysin ที่อยู่ในโครงสร้างที่ยังไม่สามารถแสดงความเป็นพิษได้ (Proaerolysin) มีความสามารถในการจับกันอย่างจำเพาะกับโปรตีนที่อยู่ในกลุ่ม glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchored protein (Abrami et al., 2000) ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีโครงสร้างของส่วนที่เป็นไกลโคไลปิด (glycolipid) เกาะอยู่ทางด้านปลาย C-terminus ในระหว่างที่โมเลกุลโปรตีนเกิดปฏิกิริยา posttranslational modification โดยโครงสร้างของ GPI anchored protein ที่ทำหน้าที่ในการจับกับโปรตีนสารพิษ Aerolysin อย่างจำเพาะ ก็คือ ส่วนที่เป็นหมู่คาร์โบไฮเดรต (glycan) ที่เป็นองค์ประกอบของโครงสร้างที่เป็น GPI anchored นั่นเอง

โปรตีนที่อยู่ในกลุ่ม GPI anchored protein เป็นโปรตีนที่มีลักษณะพิเศษคือ ไม่มีโครงสร้างส่วนที่ยื่นเข้าไปภายในเมมเบรน (transmembrane domain) ดังนั้นจึงไม่มีโครงสร้างของโปรตีนที่ยื่นเข้าไปภายในเซลล์ (cytosolic domain) ซึ่งโปรตีนในกลุ่มนี้สามารถเกาะติดอยู่บนผิวของเยื่อหุ้มเซลล์ได้โดยอาศัยโครงสร้างที่เป็น GPI anchored โครงสร้างดังกล่าวประกอบด้วยหมู่ phosphatidylinositol (PI) ซึ่งเชื่อมต่ออยู่กับหมู่คาร์โบไฮเดรต คือ กลูโคซามิน (glucosamine) น้ำตาลแมนโนส (mannose) จำนวน 3 โมเลกุล และ เอธาโนลามินฟอสเฟต (ethanolamine phosphate) ซึ่งเชื่อมต่อด้วยพันธะเอไมด์กับโครงสร้างทางด้านปลาย C-terminus ของโมเลกุลโปรตีน โดยหลักฐานการศึกษาที่สนับสนุนว่าโปรตีนในกลุ่ม GPI anchored protein ทำหน้าที่เป็นโปรตีนตัวรับที่จำเพาะสำหรับโปรตีนสารพิษ Aerolysin คือ การนำเซลล์เป้าหมายสำหรับโปรตีนสารพิษมาทำให้เกิดปฏิกิริยากับสาร phosphatidyl inositol-specific phospholipase C (PI-PLC) ซึ่งจะมีผลทำให้โมเลกุลของ GPI anchored protein หลุดออกจากบริเวณผิวของเยื่อหุ้มเซลล์ พบว่าสามารถลดการแสดงความเป็นพิษของโปรตีนสารพิษ Aerolysin ที่มีต่อเซลล์เป้าหมายได้ ซึ่งแสดงให้เห็นความสามารถในการจับกันได้อย่างจำเพาะระหว่างโปรตีนสารพิษ Aerolysin กับโปรตีน GPI anchored protein ที่ทำหน้าที่เป็นตัวรับที่จำเพาะสำหรับโปรตีนสารพิษ Aerolysin นอกจากนี้ยังมีการศึกษาพบว่าโปรตีนสารพิษ Aerolysin สามารถจับกับโปรตีนในกลุ่ม GPI anchored protein ได้หลายชนิด โดยโปรตีนแต่ละชนิดนั้นไม่มีความคล้ายคลึงกันของลำดับกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบ ตัวอย่างโปรตีนในกลุ่ม GPI anchored protein ที่มีความสามารถในการจับกับโปรตีนสารพิษ Aerolysin ได้อย่างจำเพาะ เช่น โปรตีน Thy-1 ซึ่งเป็นไกลโคโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบหลักบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์เม็ดเลือดขาว T-lymphocyte และเซลล์ประสาทของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Nelson et al., 1997) โปรตีน contactin ซึ่งเป็นโมเลกุลโปรตีนที่ยึดติดกับเซลล์สมอง (brain cell adhesion molecule) (Diep et al., 1988) CD14 ซึ่งเป็น monocyte differentiation factor และ โปรตีน Semaphorin K1 ซึ่งเป็น GPI anchored protein ที่เป็นองค์ประกอบบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์สมอง เป็นต้น

2.2.2 โปรตีนสารพิษ ε-toxin จากแบคทีเรีย *Clostridium perfringens*

แบคทีเรียในสกุล *Clostridium* spp. เป็นแบคทีเรียแกรมบวก (Gram positive) ที่มีการดำรงชีวิตแบบไม่อาศัยออกซิเจน ซึ่งสามารถพบได้ทั่วไปบริเวณพื้นดิน แหล่งน้ำเสีย ตามแหล่งน้ำต่างๆ นอกจากนี้บางสายพันธุ์ของแบคทีเรียชนิดนี้ยังเป็น normal flora ภายในกระเพาะอาหารและลำไส้ของมนุษย์ *Clostridium perfringens* เป็นแบคทีเรียสกุลหนึ่งในกลุ่มของแบคทีเรีย *Clostridium* spp. ที่เป็นสาเหตุของโรคที่เกิดในมนุษย์หลายชนิด เช่น โรคเนื้อเยื่อเน่าตาย (gas

gangrene) และมีการสร้างแก๊สขึ้น ซึ่งเกิดจากการติดเชื้อ *C. perfringens* โรคที่เกิดจากภาวะอาหารเป็นพิษ และ โรคลำไส้อักเสบ (necrotic enteritis) เป็นต้น

แบคทีเรีย *C. perfringens* สามารถแบ่งออกเป็น 5 สายพันธุ์ คือ A B C D และ E โดยแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์นี้มีความสามารถในการผลิตโปรตีนสารพิษ โดยโปรตีนสารพิษที่สร้างจากแบคทีเรียกลุ่มนี้แบ่งออกเป็น 5 ชนิดคือ α- toxin β-toxin ε-toxin และ ι- toxin โปรตีนสารพิษ ε-toxin เป็นโปรตีนสารพิษที่สร้างจากแบคทีเรีย *C. perfringens* เพียงสองสายพันธุ์คือ *C. perfringens* สายพันธุ์ B และ สายพันธุ์ D โปรตีนสารพิษ ε-toxin (Epsilon toxin) เป็นโปรตีนที่มีขนาด 32.5 kDa ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบจำนวน 311 กรดอะมิโน โปรตีนสารพิษชนิดนี้จะถูกสังเคราะห์ขึ้นให้อยู่ในโครงสร้างที่ยังไม่สามารถทำงานเพื่อแสดงความเป็นพิษได้ ซึ่งจะถูกเปลี่ยนแปลงเป็นโปรตีนสารพิษ ε-toxin ที่สามารถแสดงความเป็นพิษได้โดยการเกิดปฏิกิริยาการถูกย่อยด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีน เช่น เอนไซม์ทริปซิน (Trypsin) เอนไซม์ไคโมทริปซิน (Chymotrypsin) และ เอนไซม์แลมป์ดาโปรติเอส (λ-protease) เป็นต้น (Alouf and Popoff, 2006)

จากการศึกษาเกี่ยวกับลำดับกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของโปรตีนสารพิษ ε-toxin พบว่าโปรตีนสารพิษ ε-toxin ไม่มีลำดับกรดอะมิโนที่มีความคล้ายคลึงกับลำดับกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของโปรตีนใดๆ ที่มีการทราบโครงสร้างที่แน่นอนแล้ว ซึ่งมีอยู่ภายในฐานข้อมูล อย่างไรก็ตามลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนสารพิษ ε-toxin กลับมีความคล้ายคลึงกับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนสารพิษ Mtx2 และ Mtx3 ที่สร้างโดยแบคทีเรีย *B. sphaericus* โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (identity) เท่ากับ 26% และ 23% ตามลำดับ ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าโปรตีนสารพิษ Mtx2 Mtx3 และ ε-toxin อาจมีกลไกในการแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์เป้าหมายที่เป็นไปในลักษณะเดียวกัน (Thanabalu and Porter, 1996; Liu et al., 1996) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนภายในโครงสร้างของโปรตีนสารพิษ ε-toxin เพื่อศึกษาหากรดอะมิโนที่มีความสำคัญต่อการแสดงความเป็นพิษของโปรตีนสารพิษ ε-toxin ซึ่งจากการศึกษาพบว่า กรดอะมิโนทริปโตแฟน (Tryptophan) (W203) กรดอะมิโนไทโรซิน (Tyrosine) (Y17 Y29 Y33 Y35 Y42 Y43 Y49 Y63 Y79 Y84 Y146 Y182 Y217 Y244 Y267 และ Y285) และ กรดอะมิโนฮิสทิดิน (Histidine) (H119 H162) เป็นกรดอะมิโนที่มีความสำคัญต่อกลไกการแสดงความเป็นพิษของโปรตีนสารพิษ ε-toxin รวมถึงปฏิกิริยาการจับกันระหว่างโปรตีนสารพิษ ε-toxin กับโปรตีนตัวรับที่จำเพาะที่มีอยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์เป้าหมาย (Sakurai and

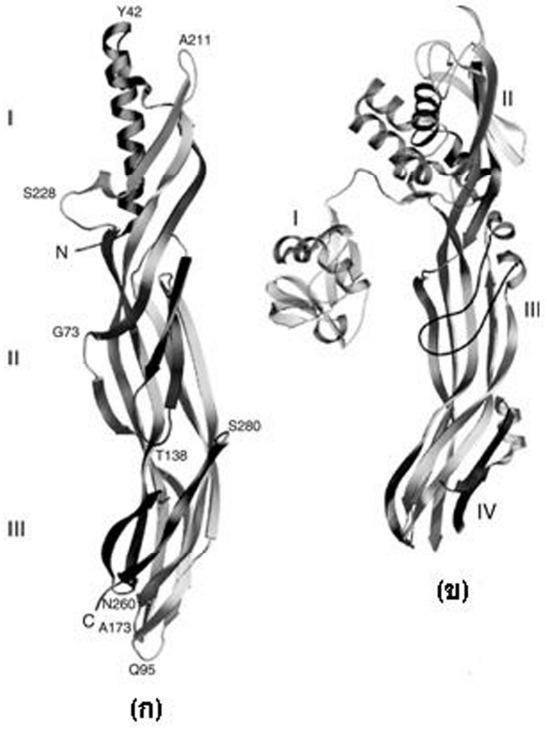
Nagahama, 1985; Sakurai and Nagahama, 1987a; Sakurai and Nagahama, 1987b; Payne and Osten, 1997)

นอกจากนี้จากการเปรียบเทียบโครงสร้างของโปรตีนสารพิษ ε-toxin พบว่าโครงสร้างของโปรตีนสารพิษดังกล่าวมีความคล้ายคลึงกับโครงสร้างของโปรตีนสารพิษ Aerolysin จากแบคทีเรีย *Ae. hydrophila* อย่างเห็นได้ชัด ดังแสดงในภาพที่ 4

ภาพที่ 4

โครงสร้างสามมิติของโปรตีน ε-toxin และ โปรตีน Aerolysin

ภาพแสดงการเปรียบเทียบโครงสร้างสามมิติแบบริบบิ้น (Ribbon structure) ของโปรตีน ε-toxin จากแบคทีเรีย *Clostridium perfringens* (ก) และโปรตีน Aerolysin จากแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* (ข)



ที่มา : Alouf and Popoff, 2006

ถึงแม้ว่าโปรตีนสารพิษทั้งสองชนิดจะมีความคล้ายคลึงกันของลำดับกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบเพียง 14% โดยโครงสร้างของโปรตีนสารพิษทั้งสองชนิดจะมีการจัดเรียงของ

โครงสร้างส่วนที่เป็น β-sheet ที่เหมือนกัน นอกจากนี้โปรตีนสารพิษทั้งสองชนิดยังมีคุณสมบัติอื่นๆที่เหมือนกัน ตัวอย่างเช่น การที่โปรตีนสารพิษทั้งสองชนิดมีการจัดเรียงโครงสร้างเป็น heptameric complex ในขั้นตอนการแสดงความเป็นพิษ และอีกทั้งโปรตีนสารพิษทั้งสองชนิดยังถูกสร้างและปล่อยออกสู่ภายนอกเซลล์ในโครงสร้างที่ยังไม่สามารถทำงานได้ (prototoxin) ซึ่งสามารถถูกกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นโครงสร้างที่สามารถแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์เป้าหมายได้โดยการตัดโครงสร้างทางด้าน C-terminus ออกไปโดยการทำงานของเอนไซม์ย่อยโปรตีน อย่างไรก็ตามความแตกต่างระหว่างโครงสร้างของโปรตีนสารพิษทั้งสองที่สามารถสังเกตได้ชัดคือ การที่โปรตีนสารพิษ Aerolysin มีโครงสร้างหลักที่เพิ่มขึ้นในซึ่งก็คือโครงสร้างในโดเมนที่ 1 มากกว่าจำนวนโดเมนที่เป็นองค์ประกอบของโครงสร้างของโปรตีนสารพิษ ε-toxin ดังแสดงในภาพที่ 4 โดยโดเมนที่ 1 ของโปรตีนสารพิษ ε-toxin แสดงให้เห็นถึงความคล้ายคลึงกับโครงสร้างในโดเมนที่ 2 ของโปรตีนสารพิษ Aerolysin ซึ่งโครงสร้างส่วนนี้ของโปรตีนสารพิษ Aerolysin จะทำหน้าที่ในการจับกับโปรตีนตัวรับที่เป็น GPI anchored protein ที่มีอยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์เป้าหมาย ซึ่งอาจจะเป็นไปได้ว่าโครงสร้างที่คล้ายคลึงกันในโดเมนที่ 1 ของโปรตีนสารพิษ ε-toxin น่าจะทำหน้าที่ในการจับกับโปรตีนตัวรับเช่นกัน ในขณะที่โดเมนที่ 2 ของโปรตีนสารพิษ ε-toxin มีความคล้ายคลึงกับโครงสร้างในโดเมนที่ 3 ของโปรตีนสารพิษ Aerolysin ซึ่งจากการศึกษาโปรตีนสารพิษ α-toxin จากแบคทีเรีย *C. septicum* ซึ่งเป็นโปรตีนสารพิษที่มีความคล้ายคลึงกับโปรตีนสารพิษ Aerolysin สามารถสันนิษฐานได้ว่าโครงสร้างโดเมนที่ 3 ของโปรตีนสารพิษ Aerolysin น่าจะทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการการแทรกตัวเข้าไปภายในเยื่อหุ้มเซลล์ (membrane insertion) (Alouf and Popoff, 2006) นอกจากนี้โครงสร้างโดเมนที่ 3 ของโปรตีนสารพิษ ε-toxin ซึ่งเป็นโครงสร้างที่อยู่ทางด้านปลาย C-terminus โดยโครงสร้างดังกล่าวมีความสำคัญในขั้นตอนการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีนสารพิษให้อยู่ในโครงสร้างที่สามารถทำหน้าที่ในการแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์เป้าหมายได้ อย่างไรก็ตามกลไกการออกฤทธิ์ของโปรตีนสารพิษ ε-toxin จะต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

2.2.3 โปรตีนสารพิษ Parasporin-2 **จากแบคทีเรีย** ***Bacillus thuringiensis***

ดังที่ได้กล่าวถึงข้างต้นเกี่ยวกับแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* ในการสังเคราะห์ผลึกโปรตีน (parasporal inclusion หรือ crystal) ที่ประกอบด้วยโปรตีน Crystal (Cry) toxin และ Cytolytic (Cyt) toxin ที่มีความสามารถในการออกฤทธิ์ต่อลูกน้ำยุง ซึ่งจะมีความแตกต่างกันทั้งขนาดของผลึกโปรตีน รวมทั้งกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบที่แตกต่างกันในแบคทีเรีย *B. thuringiensis* แต่ละสายพันธุ์ อย่างไรก็ตามจากการศึกษาเมื่อไม่นานมานี้โดยได้มีการ

ทำการศึกษาแยกแบคทีเรีย *B. thuringiensis* สายพันธุ์ที่ไม่มีการแสดงความเป็นพิษต่อลูกน้ำยุง รวมทั้งแมลงชนิดอื่นๆ (noninsecticidal strains) พบว่าแบคทีเรีย *B. thuringiensis* สายพันธุ์ที่ไม่มีการแสดงความเป็นพิษต่อแมลงดังกล่าว มีการสังเคราะห์กลุ่มโปรตีนที่ประกอบด้วยโปรตีนหลายชนิดที่มีความสามารถในการแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งในมนุษย์ กลุ่มโปรตีนดังกล่าวคือ กลุ่มโปรตีน Parasporins ซึ่งประกอบด้วยโปรตีน Parasporin-1 Parasporin-2 Parasporin-3 และ Parasporin-4 ตามลำดับ (Katayama et al., 2005; Ito et al., 2004; Yamashita et al., 2000; Lee et al., 2000) จากการศึกษาเพื่อจัดจำแนกกลุ่มโปรตีนชนิดนี้พบว่าไม่สามารถจัดจำแนกให้อยู่ในกลุ่มโปรตีน Cry หรือโปรตีน Cyt ได้ อันเนื่องมาจากการขาดความสามารถในการแสดงความเป็นพิษต่อแมลง อีกทั้งยังขาดความสามารถในการทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงแตก (hemolytic activity) อย่างไรก็ตามผู้ศึกษาได้จัดจำแนกให้โปรตีน Parasporin อยู่ในกลุ่มของโปรตีน Cry ในการจัดจำแนกโปรตีนจากแบคทีเรีย *B. thuringiensis* โดยอาศัยความคล้ายคลึง (similarity) ของลำดับกรดอะมิโนเป็นเกณฑ์

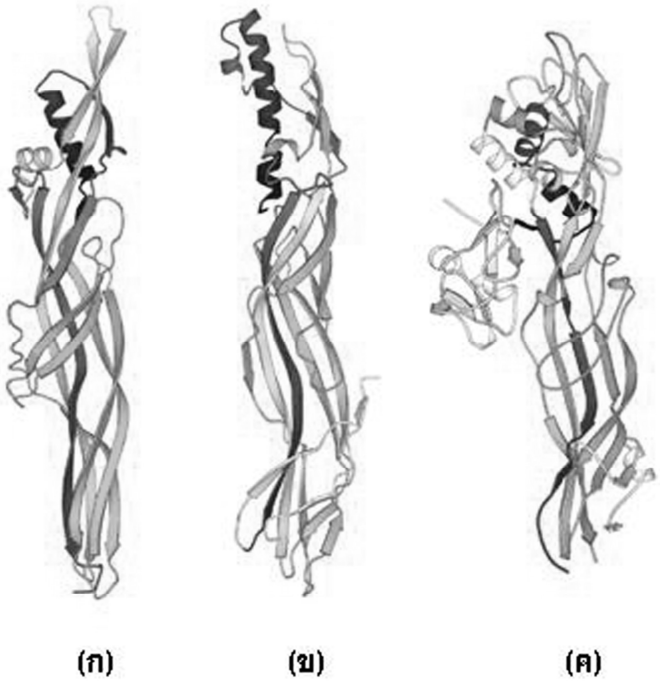
โปรตีน Parasporin-2 จากแบคทีเรีย *B. thuringiensis* สายพันธุ์ A1547 เป็นโปรตีนชนิดหนึ่งในกลุ่มของโปรตีน Parasporin โดยแบคทีเรียจะสังเคราะห์โปรตีน Parasporin-2 ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีขนาด 37 kDa และยังคงอยู่ในโครงสร้างที่ยังไม่สามารถแสดงความเป็นพิษได้ (protoxin) จากนั้นโปรตีน Parasporin-2 ดังกล่าวจะถูกกระตุ้นโดยการทำหน้าที่ของเอนไซม์ย่อยโปรตีนซึ่งจะทำการตัดลำดับกรดอะมิโนทางด้าน N- และ C-terminus เป็นจำนวนกรดอะมิโน 51 และ 36 กรดอะมิโน ตามลำดับ ทำให้ได้โปรตีน Parasporin-2 ที่มีขนาดประมาณ 30 kDa ซึ่งอยู่ในอยู่ในโครงสร้างพร้อมจะแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์เป้าหมาย (active toxin) (Akiba et al., 2009) ซึ่งจากการศึกษาความสามารถในการแสดงความเป็นพิษของโปรตีน Parasporin-2 จากแบคทีเรีย *B. thuringiensis* สายพันธุ์ A1547 พบว่าโปรตีน Parasporin-2 มีความสามารถในการออกฤทธิ์ต่อเซลล์ที่มีลักษณะเป็นเซลล์มะเร็งหลายชนิด เช่น เซลล์ hepatocellular carcinoma cell line HepG2 เซลล์ CACO-2 colon cancer และ เซลล์ human leukemia T-cells เป็นต้น โดยผลที่เกิดจากการแสดงความเป็นพิษของโปรตีน Parasporin-2 ที่มีต่อเซลล์เป้าหมาย มีผลทำให้เซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology) ได้หลายลักษณะ เช่น การบวมของเซลล์ (cell blebbing) การทำให้เซลล์แตก (lysis) นอกจากนี้ยังมีผลทำให้ไม่มีการรวมกลุ่มกันของไมโครทูบูล (microtubules) และเส้นใยแอกติน (actin filaments) ซึ่งเป็นโครงร่างแข็งภายนอกที่มีหน้าที่สำคัญเกี่ยวข้องกับการคงรูปร่างของเซลล์ อีกทั้งยังมีผลก่อให้เกิดความเสียหาย (fragmentation) แก่ไมโตคอนเดรีย (mitochondria) และเอนโดพลาสมิก เรติคูลัม

(endoplasmic reticulum) โดยความเสียหายที่เกิดขึ้นมีความเกี่ยวข้องกับการรวมกลุ่มของโปรตีน Parasporin-2 บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งมีผลทำให้เยื่อหุ้มเซลล์มีการเปลี่ยนแปลงการยอมให้สารต่างๆผ่านเข้าออก (membrane permeability) อย่างรวดเร็ว (Akiba et al., 2009)

อย่างไรก็ตามจากการศึกษาเกี่ยวกับลำดับกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของโปรตีน Parasporin-2 พบว่าลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนชนิดนี้ไม่มีความคล้ายคลึงกับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนในกลุ่ม crystal protein ใดๆ แต่กลับมีลำดับกรดอะมิโนที่มีความเหมือน (identity) กับโปรตีน Cry15Aa1 ด้วยเปอร์เซ็นต์ความเหมือน 23.5% โปรตีน Cry15Aa1 เป็นโปรตีนในกลุ่มโปรตีน MTX-like group ซึ่งเป็นกลุ่มโปรตีน Cry ที่มีโครงสร้างสัมพันธ์กับโปรตีน Mtx2 และ Mtx3 จากแบคทีเรีย *B. sphaericus* (Akiba et al., 2009) จากโครงสร้างที่สัมพันธ์กันดังกล่าวมีผลทำให้โปรตีน Parasporin-2 มีโครงสร้างและลำดับกรดอะมิโนที่มีความเหมือนกับโปรตีนในกลุ่ม β-pore-forming toxins (β-PFTs) ซึ่งประกอบด้วยโปรตีนสารพิษ Aerolysin จากแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* และโปรตีนสารพิษ ε-toxin จากแบคทีเรีย *Clostridium perfringens* ซึ่งมีกลไกการแสดงความเป็นพิษที่เกี่ยวข้องกับการทำให้เกิดรูรั่วที่มีลักษณะเป็น β-barrel pore บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์เป้าหมาย ดังนั้นจากหลักฐานของผลที่เกิดจากการแสดงความเป็นพิษและลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน Parasporin-2 ที่มีความเหมือนกับโปรตีนสารพิษทั้งสองชนิด จึงอาจมีความเป็นไปได้ที่กลไกการแสดงความเป็นพิษของโปรตีน Parasporin-2 น่าจะเกี่ยวข้องกับการเกิดรูรั่วบนเยื่อหุ้มเซลล์เป้าหมายด้วยเช่นกัน การเปรียบเทียบโครงสร้างที่มีความคล้ายคลึงกันระหว่างโปรตีน Parasporin-2 โปรตีน Aerolysin และโปรตีน ε-toxin แสดงในภาพที่ 5

ภาพที่ 5

โครงสร้างสามมิติของโปรตีน Parasporin-2 โปรตีน ε-toxin และ โปรตีน Aerolysin ภาพแสดงการเปรียบเทียบโครงสร้างสามมิติแบบริบบิ้น (Ribbon structure) ของโปรตีน Parasporin-2 จากแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* (ก) โปรตีน ε-toxin จากแบคทีเรีย *Clostridium perfringens* (ข) และโปรตีน Aerolysin จากแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* (ค)



ที่มา : Akiba et al., 2009

2.3 Brush Border Membrane บริเวณเป้าหมายสำหรับโปรตีนสารพิษจากแบคทีเรีย

จากกลไกในการแสดงความเป็นพิษต่อลูกน้ำยุงโดยทั่วไปของโปรตีนสารพิษจากแบคทีเรีย*B. thuringiensis* และ *B. sphaericus* ดังที่ได้กล่าวถึงตอนต้น ภายหลังจากการที่โปรตีนสารพิษถูกทำให้อยู่ในโครงสร้างที่พร้อมที่จะทำงานได้ (active toxin) โปรตีนสารพิษจะเข้าจับกับโปรตีนตัวรับ (receptor) ที่มีอยู่บนเซลล์กระเพาะลูกน้ำยุงซึ่งเป็นเซลล์เป้าหมายอย่างจำเพาะ (Davidson, 1988; Charles and Nielson-Leroux, 1992; Charles et al., 1996) ทำให้

บริเวณนั้นมีการแทรกตัวของโครงสร้างโปรตีนบางส่วนเข้าไปภายในเยื่อหุ้มเซลล์ ก่อให้เกิดความเสียหายแก่เซลล์และทำให้เซลล์ตายในที่สุด จากกลไกโดยทั่วไปดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าเซลล์บริเวณกระเพาะอาหารเป็นเซลล์เป้าหมายหลักในการแสดงความเป็นพิษของโปรตีนสารพิษจากแบคทีเรีย ดังนั้นเซลล์กระเพาะอาหารจึงเป็นส่วนสำคัญสำหรับการศึกษาหาโปรตีนตัวรับสำหรับโปรตีนสารพิษหลายๆชนิด โดยส่วนของเซลล์กระเพาะอาหารที่ถูกนำมาใช้ในการศึกษาเป็นส่วนที่เรียกว่า Brush border membrane (BBM) ซึ่งเป็นส่วนที่ปกคลุมผิวหน้าของไมโครวิลไล (Microvilli) ที่ยื่นออกมาจากเซลล์อิพิธิเลียม (epithelial cells) โดยจะมีลักษณะคล้ายแปรง (brush) ทำหน้าที่ในการเพิ่มพื้นที่ผิวของเซลล์เพื่อประโยชน์ในการดูดซึมสารอาหารต่างๆ ซึ่งในงานวิจัยที่มีการนำ BBM มาใช้ในการศึกษาโดยทั่วไปจะเรียก BBM ที่ได้จากการสกัดแยกจากสิ่งมีชีวิตตัวอย่างว่า Brush border membrane fraction (BBMF)

2.4 ตัวอย่างการศึกษาหาโปรตีนตัวรับสำหรับโปรตีนสารพิษจากแบคทีเรีย

2.4.1 Identification of the receptor for *Bacillus sphaericus* crystal toxin in the brush border membrane of the mosquito *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) (Silva-Filha, 1999)

วารสารงานวิจัยในชื่อเรื่อง Identification of the receptor for *Bacillus sphaericus* crystal toxin in the brush border membrane of the mosquito *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) เป็นการศึกษาเกี่ยวกับการหาโปรตีนตัวรับสำหรับโปรตีนสารพิษ Binary toxin จากแบคทีเรีย *Bacillus sphaericus* บนเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์บริเวณกระเพาะอาหารซึ่งเป็นเซลล์เป้าหมายในการแสดงความเป็นพิษของโปรตีนสารพิษจากแบคทีเรียโดยทั่วไป โดยได้ทำการศึกษาในลูกน้ำยุงรำคาญ *Culex pipiens* ซึ่งเป็นสกุลของยุงที่โปรตีนสารพิษ Binary toxin มีความสามารถในการแสดงความเป็นพิษได้ดี โดยขั้นตอนและเทคนิคต่างๆที่นำมาใช้ในการศึกษาหาโปรตีนตัวรับที่จำเพาะสำหรับโปรตีนสารพิษ Binary toxin จากแบคทีเรีย *B. sphaericus* สำหรับการศึกษานี้ ประกอบด้วยการเตรียม Brush border membrane fraction (BBMF) การใช้เทคนิคการจับกันโดยตรง (Direct binding) ระหว่างโปรตีนสารพิษ Binary toxin กับโปรตีนตัวรับที่จำเพาะ การใช้ Anion exchange chromatography ในการแยกเฉพาะส่วนของโปรตีนที่มีความสามารถในการจับกับโปรตีน Binary toxin การวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนและการวัดค่ากิจกรรมทางเอนไซม์ของโปรตีนที่มีความสามารถจับกับโปรตีน Binary toxin ดังกล่าว

ในขั้นตอนของการทดลองแรก ภายหลังจากการเสร็จสิ้นขั้นตอนการเตรียม BBMF จากลูกน้ำยุงรำคาญ *Culex pipiens* ผู้ศึกษาวิจัยได้ทำการวิเคราะห์ความสามารถของโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบจาก BBMF กับโปรตีนสารพิษ Binary toxin โดย BBMF ที่นำมาใช้ในการศึกษาในขั้นตอนนี้จะถูกทำปฏิกิริยากับสารที่แตกต่างกันสองชนิดคือ เอนไซม์ Phosphatidylinositol specific-phospholipase C (PI-PLC) และ สารละลายที่ประกอบด้วย 1mM Ethylenediamine-tetraacetic acid (EDTA) 0.1mM Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) และ 1% 3-((3-cholamidopropyl)dimethylammonio)-1-propane-sulphonate (CHAPS) โดยสารทั้งสองจะมีผลกับโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของ BBMF ได้แตกต่างกัน กล่าวคือ เอนไซม์ PI-PLC จะมีผลในการตัดโครงสร้างที่เรียกว่า Glycosyl-phosphatidylinositol (GPI) anchor ของโปรตีนที่มีอยู่บริเวณผิวของเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane protein) ซึ่งเป็นโครงสร้างที่ทำหน้าที่ในการช่วยให้โปรตีนบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์หรือผิวเซลล์ยึดติดอยู่กับผิวเซลล์ได้ ในขณะที่สารละลายอีกชนิดหนึ่งที่ CHAPS ซึ่งเป็นสารชะล้าง เป็นองค์ประกอบ สารละลายดังกล่าวนี้จะมีผลทำให้โปรตีนที่เป็นองค์ประกอบอยู่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งมีคุณสมบัติในการละลายได้น้อย ให้สามารถละลายและหลุดออกจากเยื่อหุ้มเซลล์ได้

ภายหลังจากการทำปฏิกิริยาของโปรตีนจาก BBMF ด้วยสารทั้งสองชนิดดังกล่าว ผู้ศึกษาวิจัยจึงได้ทำการเปรียบเทียบความสามารถของโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของ BBMF ในการจับกับโปรตีน Binary toxin ซึ่งถูกติดฉลากไว้ด้วย I^{125} ซึ่งเป็นกัมมันตรังสีของธาตุไอโอดีน โดยผลการศึกษาจากการทดลองนี้พบว่าโปรตีน Binary toxin- I^{125} มีความสามารถในการจับกับโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของ BBMF ที่ผ่านการเกิดปฏิกิริยาด้วยเอนไซม์ PI-PLC ด้วยเปอร์เซ็นต์ความจำเพาะที่ลดลงถึง 80% เมื่อเปรียบเทียบกับ BBMF ที่ไม่ผ่านการเกิดปฏิกิริยากับเอนไซม์ PI-PLC จากผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่าโมเลกุลของโปรตีนตัวรับสำหรับโปรตีนสารพิษ Binary toxin น่าจะเป็น GPI-anchored protein

ในขั้นตอนการศึกษาต่อไป ผู้ศึกษาวิจัยจึงได้จัดการทดลองที่เป็นการศึกษาการจับกันอย่างจำเพาะที่เกิดขึ้นระหว่างโปรตีนตัวรับ ซึ่งเป็นโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของ BBMF กับโปรตีน Binary toxin- I^{125} จากนั้นจึงทำการสกัดแยกส่วนของโปรตีนที่สามารถจับกับโปรตีน Binary toxin- I^{125} ได้อย่างจำเพาะโดยใช้ Anion exchange chromatography ภายหลังจากขั้นตอนการสกัดแยก โปรตีนดังกล่าวจะถูกวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) และเทคนิค Western blot ผลจากการ

วิเคราะห์แสดงแถบของโปรตีนที่มีขนาดประมาณ 60 kDa ที่มีความสามารถจับกับโปรตีน Binary toxin- I^{125}

จากนั้นผู้ศึกษาวิจัยจึงทำการการศึกษาเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของโปรตีนขนาด 60 kDa ดังกล่าว โดยผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่ากรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของโปรตีนขนาด 60 kDa นี้ มีความคล้ายคลึงกับโปรตีน maltase-like proteins ซึ่งเป็นโปรตีนที่อยู่ในกลุ่มของเอนไซม์ α-amylase อย่างไรก็ตามผู้ศึกษาวิจัยได้จัดการทดลองเพื่อทำการศึกษาความสามารถในการเกิดกิจกรรมทางเอนไซม์ (enzyme activity) ของโปรตีน 60 kDa ดังกล่าวนี้ โดยผู้ศึกษาได้ทำการวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ชนิดต่างๆ ประกอบด้วย เอนไซม์ Leucine aminopeptidase เอนไซม์ α-amylase และ เอนไซม์ α-glucosidase โดยผลการศึกษาในการทดลองนี้สามารถให้ผลที่สรุปได้ว่าโปรตีนขนาด 60 kDa ซึ่งมีความสามารถในการจับกับโปรตีนสารพิษ Binary toxin จากแบคทีเรีย *B. sphaericus* ได้อย่างจำเพาะ ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่สำคัญของโปรตีนที่จะทำหน้าที่เป็นตัวรับ น่าจะเป็นเอนไซม์ α-glucosidase (Silva-Filha, 1999)

2.4.2 Proteomic identification of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* toxin Cry4Ba binding proteins in midgut membranes from *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* Linnaeus (Diptera, Culicidae) larvae (Bayyareddy et al., 2009)

วารสารงานวิจัยในชื่อเรื่อง Proteomic identification of *Bacillus thuringiensis* sups. *israelensis* toxin Cry4Ba binding proteins in midgut membrane from *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* Linnaeus (Diptera, Culicidae) larvae เป็นการศึกษาเกี่ยวกับการหาโปรตีนที่ทำหน้าที่เป็นตัวรับสำหรับโปรตีนสารพิษ Cry4Ba จากแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* sups. *israelensis* บนเยื่อหุ้มเซลล์กระเพาะอาหารของลูกน้ำยุงลาย *Aedes aegypti* โดยขั้นตอนและเทคนิคต่างๆที่นำมาใช้ในการศึกษาหาโปรตีนตัวรับที่จำเพาะสำหรับโปรตีนสารพิษ Cry4Ba จากแบคทีเรีย *B. thuringiensis* sups. *israelensis* สำหรับการศึกษานี้เป็นการใช้ประโยชน์จากเทคนิคที่ใช้ในการศึกษาโปรตีน (Proteomics) ขั้นตอนการศึกษาต่างๆ ประกอบด้วยการเตรียม Brush border membrane fraction (BBMF) การเตรียมโปรตีน Cry4Ba และการติดฉลากโปรตีนสารพิษ Cry4Ba ด้วย I^{125} การวิเคราะห์โปรตีน BBMF ด้วยเทคนิค SDS-PAGE และ 2 Dimensional gel-Electrophoresis (2D-E) การศึกษาการจับกันระหว่างโปรตีนสารพิษ Cry4Ba กับโปรตีนตัวรับที่จำเพาะด้วยเทคนิค Ligand blot และการวิเคราะห์เพื่อจัดจำแนกชนิดของโปรตีนด้วยเทคนิค Matrix-Assised Laser Desorption/Ionisation-Time of Flight/Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF/TOF MS) และการเปรียบเทียบผลที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยข้อมูลของโปรตีนที่มีอยู่ภายในฐานข้อมูล

ในขั้นตอนของการทดลองแรก ภายหลังจากการเสร็จสิ้นขั้นตอนการเตรียม BBMF จากลูกน้ำยุงลาย *Aedes aegypti* ผู้ศึกษาได้ทำการเตรียมตัวอย่างโปรตีนจาก BBMF สำหรับการวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE และ 2D-E จากนั้นจึงทำการวิเคราะห์โปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของ BBMF ภายหลังจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE และ 2D-E โปรตีนซึ่งถูกแยกบนเจลโพลิอะคริลาไมด์จะถูกถ่ายโอนลงบนแผ่น PVDF เมมเบรน ซึ่งเป็นพื้นผิวรองรับ จากนั้นโปรตีนบนแผ่น PVDF ดังกล่าวจะถูกนำมาทำการศึกษาการจับกันระหว่างโปรตีน Cry4Ba-I^{125} กับโปรตีนตัวรับที่จำเพาะด้วยเทคนิค Ligand blot ซึ่งผลที่ได้พบว่าโปรตีน Cry4Ba-I^{125} สามารถจับกับโปรตีนจาก BBMF ที่ถูกแยกตามขนาดของโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE ที่มีขนาด 141 102 89 82 64 55 45 30 และ 25 kDa ตามลำดับ ในขณะที่โปรตีน Cry4Ba-I^{125} จะสามารถจับกับโปรตีนที่ถูกแยกด้วยเทคนิค 2D-E ที่มีขนาด 65 55 และ 42 kDa ตามลำดับ หลังจากนั้นจึงทำการเปรียบเทียบตำแหน่งของโปรตีนที่มีความสามารถในการจับกับโปรตีน Cry4Ba-I^{125} บนแผ่น PVDF เมมเบรนกับตำแหน่งของโปรตีนบนเจลโพลิอะคริลาไมด์ จากนั้นผู้ศึกษาจึงทำการวิเคราะห์โปรตีนที่มีความสามารถในการจับกับโปรตีน Cry4Ba-I^{125} ด้วยเทคนิค MALDI-TOF/TOF MS ซึ่งเมื่อทำการเปรียบเทียบผลที่ได้จากการวิเคราะห์กับข้อมูลของโปรตีนที่มีอยู่ภายในฐานข้อมูล ซึ่งผลจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค MALDI-TOF/TOF MS แสดงให้เห็นว่าโปรตีนขนาดต่างๆที่ตรวจพบว่ามีความสามารถในการจับกับโปรตีน Cry4Ba-I^{125} ได้อย่างจำเพาะคือโปรตีน V-ATPase B subunit โปรตีน ATP synthase alpha subunit โปรตีน protease m1 zinc metalloprotease โปรตีน actin 6 โปรตีน actin โปรตีน flotillin-1 โปรตีน alkaline phosphatase โปรตีน ATP synthase beta subunit โปรตีน serine protease โปรตีน mito-processing peptidase beta subunit โปรตีน V-ATP synthase subunit E โปรตีน prohibitin และโปรตีน mito-porin