

รายงานฉบับสมบูรณ์ (ร่าง) (1 ตุลาคม 2555 – 30 กันยายน 2556)

ชื่อโครงการวิจัย การศึกษาบทบาทของกรดอะมิโนในโปรตีนสารพิษ Cyt2Aa2 จาก *Bacillus thuringiensis* ที่มีความสำคัญต่อการจับกับเยื่อหุ้มเซลล์

Investigation of membrane binding sites of *Bacillus thuringiensis* Cyt2Aa2 toxin

หัวหน้าโครงการ ผศ.ดร.อัญชนิ์ คุเบอรา

ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

บทคัดย่อ

โปรตีน Cyt2Aa2 เป็นโปรตีนสารพิษที่สร้างจากแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* subsp. *darmstadiensis* โปรตีนชนิดนี้เป็นพิษต่อแมลงในอันดับ Diptera และเซลล์บางชนิด เช่น เซลล์เม็ดเลือดแดง กลไกการทำงานของโปรตีนนี้คือจับกับเยื่อหุ้มเซลล์ และทำให้เกิดรูรั่วโดยการเกิดโครงสร้างที่เป็น oligomerization และส่งผลให้เกิดการตายของเซลล์ในที่สุด ในงานวิจัยนี้ต้องการศึกษาบทบาทที่สำคัญของกรดอะมิโนบางตำแหน่ง (I139, S159, L160, S161, A162, D209 and V215) ของโปรตีน Cyt2Aa2 ซึ่งเกี่ยวข้องกับการจับกันของโปรตีนชนิดนี้กับไขมันของเยื่อหุ้มเซลล์ ผู้วิจัยได้ทำการทดลองเปลี่ยนกรดอะมิโนตำแหน่งดังกล่าวเป็นกรดอะมิโน alanine ด้วยวิธี site-directed mutagenesis หลังจากนั้นถ่ายพลาสมิดกลายพันธุ์เข้าสู่ *E.coli* เพื่อให้สร้างโปรตีนกลายพันธุ์ พบว่า โปรตีนกลายพันธุ์เกือบทุกตัวมีการแสดงออกในรูปของ inclusion body ยกเว้นโปรตีน I139A มีการแสดงออกที่ต่ำมาก เมื่อนำโปรตีนกลายพันธุ์ที่แสดงออกได้มาละลายใน 50 mM carbonate buffer pH 10.5 พบว่า โปรตีน V215A ไม่ละลายในบัฟเฟอร์ดังกล่าว โปรตีน S159A, L160A, S161A, A162V, D209N สามารถละลายได้ในบัฟเฟอร์และถูกตัดด้วย proteinase K ได้เป็น activated toxin จากการทดลองการออกฤทธิ์ต่อลูกน้ำยุงลายและการทำให้เม็ดเลือดแดงแตก พบว่า S159A, L160A และ S161A ทำให้เม็ดเลือดแดงแตกได้และออกฤทธิ์ต่อลูกน้ำยุงลายในระดับที่รุนแรงน้อยกว่า wild type ผลการทดลองการจับกันของโปรตีนกับเยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดแดง พบว่า S159A, L160A และ S161A สามารถเกิดโครงสร้างแบบ oligomerization และจับกับเยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดแดงได้ ในขณะที่ A162V, D209N ไม่เกิดโครงสร้างดังกล่าว จากผลการทดลองทั้งหมดนี้ แสดงให้เห็นว่า กรดอะมิโนบางตำแหน่งที่ loop ระหว่าง  $\beta$ -4 และ  $\beta$ -5 และ  $\beta$ -7 มีความสำคัญต่อการจับของโปรตีนกับเยื่อหุ้มเซลล์ และการเกิด oligomerization ของโปรตีนนี้ การเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนบางตำแหน่งในบริเวณดังกล่าว มีผลทำให้การทำงานและโครงสร้างของโปรตีนเปลี่ยนแปลงไป

## Abstract

Cyt2Aa2 is a cytolytic toxin produced from *Bacillus thuringiensis* subsp. *darmstadiensis*. It is specifically toxic against Dipteran larvae *in vivo*, and also active to several cell types such as erythrocytes. The active toxin is proposed to bind to cell membrane, leading to the

formation of membrane pore by toxin oligomerization and eventually cell lysis. This study aimed to characterize the role of expected lipid binding residues (I139, S159, L160, S161, A162, D209 and V215) of Cyt2Aa2. Alanine scanning mutants were constructed by site-directed mutagenesis and expressed in *E. coli*. These mutants were expressed as inclusion bodies which were solubilized in 50 mM carbonate buffer pH 10.5. All mutants, except I139A and V215A could retain as activated toxins after proteinase K cleavage. Three mutants, S159A, L160A and S161A showed high hemolytic activity but low toxicity against *A. aegypti*. Membrane interaction assays showed that these mutants bound and formed complexes on rat red blood cells. Substitution by valine at A162 and asparagine at D209 could interfere membrane binding and oligomerization of the toxin. These mutants could not completely break RBC even at high concentration and showed no hemolytic activity. The mutant A162V showed no toxicity against *A. aegypti*, but D209N showed low toxicity against *A. aegypti*. Our data suggested that amino acids on loop between  $\beta 4$ ,  $\beta 5$  and  $\beta 7$  of Cyt2Aa2 toxin were involved in membrane binding as well as complex formation. Substitution of amino acids in these regions altered the biological activity. Selectivity of the toxin to certain target cells might be improved by amino acid replacement in these regions.

### ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

*Bacillus thuringiensis* (Bt หรือ บีที) เป็นแบคทีเรียแกรมบวก เซลล์รูปแท่ง ที่พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ โดยแบคทีเรียนี้สามารถผลิตโปรตีนที่เป็นพิษต่อแมลงได้หลายชนิด หนึ่งในโปรตีนที่เป็นพิษที่ *B. thuringiensis* ผลิตได้คือ กลุ่ม Cytolytic toxin (Cyt) ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีการสร้างขึ้นในขณะที่ *B. thuringiensis* มีการสร้าง endospore [1] โปรตีนนี้เมื่อถูกย่อยบางส่วนจะได้สารพิษเข้าทำลายเยื่อบุกระเพาะอาหารส่วนกลาง ของแมลงทำให้เกิดรูรั่ว และตายในที่สุด [2, 3] บีทีจะทำลายแมลงเฉพาะระยะตัวอ่อนและจะออกฤทธิ์ได้ต่อเมื่อแมลงกินบีทีเข้าไป ในกระเพาะอาหารส่วนกลางแล้ว บีทีต่างสายพันธุ์จะมีฤทธิ์ทำลายแมลงต่างชนิดกันไป โปรตีน Cyt2Aa2 เป็น cytolytic toxin ที่สร้างจาก *Bacillus thuringiensis* subsp. *darmstadiensis* จะออกฤทธิ์อย่างจำเพาะต่อตัวอ่อนแมลงในอันดับ Diptera (*Culex* sp, *Stegomyia* sp.) และออกฤทธิ์ในเซลล์หลายชนิดเช่น erythrocytes และ fibroblasts [4] เนื่องจากลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนนี้ เหมือนกับ Cyt2Aa1 จาก *B. thuringiensis* subsp. *kyushuensis* ดังนั้นโปรตีน Cyt2Aa2 จึงน่าจะมีโครงสร้างที่คล้ายคลึงกับ Cyt2Aa1 ซึ่งประกอบด้วย 6  $\alpha$ -helices และ 7  $\beta$ -sheets [5, 6] ซึ่ง beta-sheets มีตำแหน่งอยู่ภายในห่อด้วย helices  $\alpha A$ ,  $\alpha B$ ,  $\alpha C$  และ  $\alpha D$  พบว่าความยาวของ helices นี้ไม่เพียงพอที่จะสร้างรูที่เยื่อหุ้มเซลล์ ในขณะที่ความยาวของ beta-sheets มีความเหมาะสมมากกว่า [3] พบว่าส่วน alpha-helices จะมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและเกาะกับเยื่อหุ้มเซลล์ และหลังจากนั้นจะแทรกส่วน beta-sheets เข้าไปในเยื่อหุ้มเซลล์โดย พบว่าโปรตีน Cyt นี้สามารถเกิดกระบวนการ oligomerization ได้ โครงสร้างที่เกิดขึ้นนี้อาจมีผลทำให้เกิดการผิดปกติของเซลล์ และส่งผลให้เซลล์ตายในที่สุด [7, 8] ซึ่ง Cyt toxin มีโครงสร้างคล้ายกับ volvatxin A2 (VVA) toxin [9] และ Evt toxin จาก *Erwinia carotovora* [10] จากการศึกษาก่อนหน้านี้ พบว่า C209 ของ Evt toxin เกี่ยวข้องกับ pamitate binding site โดยการ