บทคัดย่อ

T161445

รหัสโครงการ: RSA/14/2544

โครงการ: การศึกษาการม้วนพับตัวและเสถียรภาพของโปรตีนสารพิษจาก *Bacillus thuringiensis*

ผู้วิจัย: นายชาติชาย กฤตนัย

สถาบันอณูชีววิทยาและพันธุศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

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

ระยะเวลาโครงการ: 1 ธันวาคม 2544 – 30 พฤศจิกายน 2546

โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์หลักในการศึกษาถึงขบวนการม้วนพับและคลายตัวของโครงสร้างโปรตีนฆ่าลูกน้ำยุงลายชนิด Cry4B และวิเคราะห์ถึงบทบาทของกรดอะมิโนในตำแหน่งอนุรักษ์ต่างๆว่ามีส่วนเกี่ยวข้องอย่างไรต่อการจัดโครงสร้างและเสถียรภาพของโปรตีน ในงานวิจัยนี้ ได้ทำการผลิตโปรตีนฆ่าลูกน้ำยุงจากการแสดงออกของพลาสมิคpMU388 ในเชื้อแบคทีเรียE. Coli โปรตีนที่สกัดจากเซลได้ถูกละลายในสารละลายคาร์บอเนต pH 9-10 ตัดย่อยให้อยู่ในรูปที่สามารถทำงานได้ด้วยเอ็นไซม์ทริปซิน และผ่านการแยกบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟี จากนั้นทำการวิเคราะห์ขบวนการม้วนพับและคลายตัวของโครงสร้างโปรตีน โดยการผสมโปรตีนในสารละลาย GuHCl ที่มีความเข้มข้นต่างๆตั้งแต่ 0 - 6 โมลาร์ และตรวจสอบสภาวะของโครงสร้างโปรตีนในแต่ละสารละลายGuHClด้วยเทคนิคทางสเปคโครสโคปี จากกราฟของการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง ทำการวิเคราะห์ค่าพลังงานที่ใช้ในการปรับเปลี่ยนโครงสร้างระหว่างสภาวะปกติและสภาวะคลายตัว พลังงานดังกล่าวในโปรตีนCry4Bมีค่าเท่ากับ 17.87 กิโลแคลอรี/โมล สามารถเปรียบเทียบกับโครงสร้างที่มีการกำจัดบริเวณที่สามารถตัดย่อยภายในซึ่งมีค่า 23.10 กิโลแคลอรี/โมล ในการวิเคราะห์ทางจลศาสตร์ พบว่าค่าพลังงานกระตุ้นที่จำเป็นต่อการเปลี่ยนสภาวะโครงสร้าง มีค่าประมาณ 25 กิโลแคลอรี/โมล ค่าทางพลังงานเหล่านี้ถูกใช้ในการสร้างแผนผังของพลังงานสำหรับโปรตีน Cry4B เพื่อวิเคราะห์บทบาทของกรดอะมิโนในตำแหน่งอนุรักษ์ที่มีต่อการจัดโครงสร้างและเสถียรภาพของโปรตีน โปรตีนกลายพันธุ์จำนวนหนึ่งได้ถูกสร้างขึ้นจากโปรตีนต้นแบบ ด้วยเทคนิคการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสบนยีนของCry4B เมื่อทำการวิเคราะห์ความสามารถของการละลายในสารละลายคาร์บอเนต รูปแบบของการตัดย่อยด้วยเอ็นไซม์ทริปซิน ความสามารถในการฆ่าลูกน้ำยุง และค่าพลังงานในแผนผังของพลังงานที่ใช้ในการเปลี่ยนแปลงสภาวะโครงสร้าง พบว่าโปรตีนกลายพันธุ์จำนวนหนึ่งเกิดการเปลี่ยนแปลงในคุณสมบัติเหล่านี้ โดยในโปรตีนกลายพันธุ์ที่มีการรบกวนการจัดตัวของกรดอะมิโนที่ไม่ชอบน้ำในใจกลางของโครงสร้าง มีเสถียรภาพลดลงได้มากถึง 10.49 กิโลแคลอรี/โมล ในส่วนของโปรตีนกลายพันธุ์ที่มีทำลายพันธะไฮโดรเจนหรือพันธะระหว่างประจุบนโครงสร้างตติยภูมิ พบว่าโปรตีนเหล่านี้ไม่สามารถม้วนพับเป็นโครงสร้างปกติได้ อย่างไรก็ตาม การทำลายพันธะดังกล่าวที่เกิดขึ้นภายในโครงสร้างทุติยภูมิ ได้ให้ผลผลิตเป็นโปรตีนกลายพันธุ์ที่มีคุณสมบัติต่างๆเหมือนกับโปรตีนต้นแบบทุกประการ ผลการวิจัยนี้ได้แสดงให้เห็นว่ากรดอะมิโนในตำแหน่งอนุรักษ์มีบทบาทที่สำคัญในลักษณะต่างๆในการรักษาสภาวะและเสถียรภาพของโครงสร้างโมเลกุลของโปรตีนCry4B

ด้วยความรู้ความเข้าใจในลักษณะและบทบาทในการรักษาเสถียรภาพและโครงสร้างของโปรตีนดังกล่าว จะก่อให้เกิดประโยชน์ต่อการวิจัยเพื่อการออกแบบและปรับปรุงโครงสร้างโปรตีนเพื่อเพิ่มเสถียรภาพให้สามารถทำงานได้ดีในสภาพแวดล้อมของการใช้งานจริงต่อไป

TE 161445

Abstract

Project Code: RSA/14/2544

Project Title: Folding and Stability Analysis of Insecticidal Proteins from *Bacillus thuringiensis*

Investigators: Chartchai Krittanai

Institute of Molecular Biology and Genetics, Mahidol University

Email Address: stckt@mahidol.ac.th

Project Period: December 2001 – November 2003

This research project aims to characterize for the process of protein folding/unfolding of the *Bacillus thuringiensis* Cry4B toxin and survey for the role of conserved residues in molecular folding and stability. The 130-kDa Cry4B protoxin was expressed from pMU388 plasmid containing an encoded *cry4B* gene. An extracted protein from *E. coli* culture was solubilized in carbonate buffer pH 9-10, proteolytically processed to a 65-kDa active form by trypsin, and then purified on size exclusion liquid chromatography. The purified toxin was incubated with various concentrations of GuHCl from 0 - 6 M, and their conformational states were monitored in steady state using circular dichroism and intrinsic fluorescence spectroscopy. Based upon the folding/unfolding curve, transitional free energy between the native and unfolded states of wild type toxin was determined at 17.87 kcal/mol. The value for wild type toxin with an internal tryptic site removed (R203Q) was also obtained at 23.10 kcal/mol. Activation energy derived from kinetic study has revealed a 25.59-kcal/mol transitional barrier. These results have established a reference energy map for the folding/unfolding of the wild type Cry4B. A PCR based site-directed mutagensis was performed on a numbers of residues of the five conserved blocks. Mutational effect on these generated mutants were characterized in a series of assays including toxin solubility, trypsin-processing pattern, mosquito-larvicidal activity and changes in the energy map of folding/unfolding. Mutation that perturbs side-chain packing of the conserved hydrophobic residues inside the protein interior has led to a large structural destabilization up to 10.49 kcal/mol. Substitutions that eliminate hydrogen bond or salt bridge among the tertiary structure have revealed a significant inhibition on the folding of native structure. These mutants have completely lost their solubility, tryptic digestion pattern, and larvicidal activity. However eliminating of these bondings within the secondary structure has no effect on the toxin properties. These results have demonstrated that a numbers of conserved residues play a critical role in maintaining the integrity of molecular structure of Cry4B.

The future direction of this work is to employ these stabilizing features to the designing of mutant toxin with enhanced stability, resulting in a more environmentally stable toxin and improved efficiency.