

บทคัดย่อ

แบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* สายพันธุ์ *israelensis* เป็นแบคทีเรียที่นำมาใช้ในการควบคุมยุงและแมลงอย่างมีประสิทธิภาพ โดยแบคทีเรียนี้สามารถสร้างผลึกโปรตีนที่เป็นพิษต่อลูกน้ำยุง ซึ่งประกอบด้วย โปรตีนอย่างน้อย 4 ชนิด ได้แก่ Cry4Aa Cry4Ba Cry11Aa และ Cyt1Aa จากการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนพบว่า โปรตีน Cry4Aa และ Cry4Ba มีความใกล้เคียงกันประมาณ 55% อย่างไรก็ตาม โปรตีนทั้งคู่มีประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงในสายพันธุ์ต่างๆ แตกต่างกัน กล่าวคือ โปรตีน Cry4Ba สามารถออกฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงได้ดีในสายพันธุ์ *Aedes* (ยุงลาย) และ *Anopheles* (ยุงก้นปล่อง) แต่มีประสิทธิภาพต่ำมากในสายพันธุ์ *Culex* (ยุงรำคาญ) ในขณะที่โปรตีน Cry4Aa สามารถออกฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงได้ในทั้งสามสายพันธุ์ ในงานวิจัยที่ผ่านมาได้ทำการศึกษาโครงสร้างสามมิติของโปรตีน Cry4Ba และ Cry4Aa ซึ่งสามารถนำมาส่งเสริมความเข้าใจในกลไกการออกฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงและปรับปรุงประสิทธิภาพในการฆ่าลูกน้ำยุงร่วมกับวิธีการทางพันธุวิศวกรรม ในโครงการวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาความสัมพันธ์ของโครงสร้างและการดัดแปลงโปรตีนเพื่ออธิบายกลไกความจำเพาะเจาะจงของโปรตีนในการฆ่าลูกน้ำยุงของโปรตีน Cry4Aa โดยการสร้างโปรตีนกลายพันธุ์ Cry4Aa จากการแทนที่กรดอะมิโนและการตัดกรดอะมิโนบางตัวในตำแหน่ง Loops ที่คาดว่าเกี่ยวข้องกับกลไกการจับกับตัวตอบรับ ซึ่งจากผลการทดลองพบว่า ส่วนของ Loops นี้มีความสำคัญต่อการออกฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงและน่าจะเกี่ยวข้องกับการจับกับตัวตอบรับของโปรตีน นอกจากนี้ยังพบว่าโปรตีน Cry4Aa และ Cry4Ba สามารถเกิดปฏิสัมพันธ์กันในการออกฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุง โดยเมื่อนำโปรตีนกลายพันธุ์ที่มีความบกพร่องในกลไกที่แตกต่างกัน (โปรตีนกลายพันธุ์ Cry4Aa 4AL2ΔKY ที่มีความบกพร่องในกลไกการจับตัวตอบรับ และโปรตีนกลายพันธุ์ Cry4Ba 4BN183Q ที่มีความบกพร่องในกลไกการเกิดรูรั่ว) มาผสมกันในอัตราส่วนหนึ่งต่อหนึ่ง พบว่าโปรตีนกลายพันธุ์ผสมนี้สามารถออกฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงได้ ซึ่งการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าโปรตีน Cry4Aa และ Cry4Ba สามารถรวมกลุ่มกันเป็น hetero-oligomers ที่สามารถออกฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงร่วมกัน และข้อมูลเบื้องต้นนี้สามารถใช้เป็นแนวทางในการศึกษากลไกการทำงานเสริมกันของโปรตีน Cry4Aa และ Cry4Ba ในอนาคตต่อไปได้

Bacillus thuringiensis subsp. *israelensis* (Bti) has been effectively used as a biopesticide for mosquito and blackfly larvae control. The Bti mosquito-larvicidal activity is due to the production of four major crystal proteins composed of Cry4Aa, Cry4Ba, Cry11Aa, and Cyt1Aa. By comparison of the primary structures among Bti toxins, Cry4Aa and Cry4Ba toxins are most closely related. Despite their relatively high sequence similarity, both toxins show variable levels of toxicity against mosquito species. The Cry4Ba exhibits highly toxic activity towards *Aedes* and *Anopheles* larvae but has no significant activity against *Culex* larvae while the Cry4Aa toxin shows high toxicity against all three mosquito larvae. Recently, the X-ray crystal structures of the Cry4Ba and Cry4Aa Bti toxins have been elucidated. Hence, structural data of both Cry4Ba and Cry4Aa toxins will serve as critical information for addressing the larvicidal mechanism and also facilitate the genetic improvements of toxin activity by mutagenesis. In this study, the structural-based protein engineering was used as an approach to generate Cry4Aa mutants for elucidating the structural determinants of Cry4Aa specificity. Amino acid substitutions and deletions in three loops located at the surface of the putative receptor binding domain II of Cry4Aa were constructed. One of these exposed loops was found to be an important determinant of toxicity, presumably through attachment of Cry4Aa to the surface of mosquito cells. Furthermore, evidence of the intermolecular interaction between Cry4Aa and Cry4Ba proteins was provided. Both Cry4Aa and Cry4Ba inactive mutants affected in different steps of their mode of action (4AL2ΔKY in receptor binding and 4BN183Q in pore formation) was found to recover toxicity when mixed in a one to one ratio. This study indicates that Cry4Aa and Cry4Ba monomers can form functional hetero-oligomers and guide further investigations for the mechanism of synergism between these two proteins.