

## บทคัดย่อ

รหัสโครงการ RMU5380002  
 ชื่อโครงการ การศึกษาโครงสร้างและหน้าที่ของโปรตีนสารพิษฆ่าลูกน้ำยุงจากแบคทีเรีย *Bacillus sphaericus*  
 ชื่อนักวิจัย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ปนัดดา บุญเสริม  
 สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล  
 E-mail Address panadda.boo@mahidol.ac.th  
 ระยะเวลาโครงการ 3 ปี

แบคทีเรีย *Bacillus sphaericus* สร้างโปรตีน binary toxin ที่ประกอบด้วยโปรตีน BinA และ BinB ที่มีขนาด 42 และ 51 กิโลดาลตันตามลำดับ โปรตีนทั้งสองนี้ต้องทำงานร่วมกันในการออกฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุง โดย BinB ทำหน้าที่จับกับตัวรับจำเพาะบนเยื่อหุ้มเซลล์ และ BinA ทำหน้าที่ทำลายเซลล์ อย่างไรก็ตามกลไกการทำงานของโปรตีน binary toxin ในระดับโมเลกุลยังไม่เป็นที่เข้าใจลึกซึ้ง เนื่องจากยังขาดข้อมูลเชิงโครงสร้างของโปรตีน ในช่วงที่ยังไม่มีข้อมูลโครงสร้างของโปรตีน เราได้ทำการศึกษากลไกการทำงานของโปรตีน BinB โดยเฉพาะอย่างยิ่งทางด้านปลายอะมิโน โดยทำการเปลี่ยนแปลงลำดับกรดอะมิโนในช่วง 35-37 และ 41-43 ผลการทดสอบการฆ่าลูกน้ำยุงรำคาญ การจับกับตัวรับจำเพาะ และการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์จำลองพบว่า กรดอะมิโนตำแหน่ง P35, F41 และ Y42 มีความสำคัญต่อกลไกการฆ่าลูกน้ำยุง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในขั้นตอนการจับกับตัวรับจำเพาะ และการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ นอกจากนี้เราได้ศึกษาการทำงานของโปรตีน BinA โดยเฉพาะในกลไกการเกิดปฏิสัมพันธ์ระหว่างกรดอะมิโนชนิดอะโรมาติกกับเยื่อหุ้มเซลล์ โดยการแทนที่กรดอะมิโนชนิดอะโรมาติกในตำแหน่ง Y213, Y214, Y215, W222 และ W226 ด้วยกรดอะมิโนลิวซีน ผลการทดลองพบว่าโปรตีนกลายพันธุ์ดังกล่าวมีความสามารถในการรบกวนเยื่อหุ้มเซลล์จำลองได้เช่นเดียวกับโปรตีนต้นแบบ และผลการศึกษาการแทรกตัวเข้าสู่ชั้นไขมันที่สร้างเป็นแผ่นฟิล์มชั้นเดียว (monolayer) โดยอาศัยวิธี Langmuir-Blodgett trough พบว่าโปรตีนกลายพันธุ์ทั้งหมดสามารถแทรกตัวในชั้นไขมันได้เช่นเดียวกับโปรตีนต้นแบบ แต่จากการทดสอบการออกฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุงพบว่าประสิทธิภาพในการฆ่าลูกน้ำยุงรำคาญของโปรตีนกลายพันธุ์ W222L W226L ลดลงอย่างชัดเจน ซึ่งประสิทธิภาพในการฆ่าลูกน้ำยุงที่ลดลงนี้ อาจเกี่ยวข้องกับกลไกการทำงานในกระบวนการอื่นๆที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ของลูกน้ำยุง

เพื่อเข้าใจกลไกการทำงานของโปรตีน binary toxin ในเชิงลึกถึงระดับโมเลกุลมากยิ่งขึ้น เราได้ศึกษาโครงสร้างสามมิติของโปรตีน binary toxin โดยใช้เทคนิค X-ray crystallography ผลการศึกษาพบว่าโปรตีนชนิด BinB สามารถตกผลึกได้และกระจ่างรังสีเอ็กซ์ได้ถึงระดับความละเอียดที่ 1.75 อังสตรอม หลังจากนั้นได้นำเทคนิค Single-wavelength anomalous dispersion (SAD) มาใช้วิเคราะห์โครงสร้างสามมิติของโปรตีน BinB พบว่าโครงสร้างสามมิติของ BinB ประกอบไปด้วยสองส่วนที่แตกต่างกัน คือทางด้านปลายอะมิโนมีโครงสร้างคล้ายกับโปรตีนที่จับกับน้ำตาล หรือ lectin ส่วนทางด้านปลายคาร์บอกซิลมีรูปร่างยาวและมีโครงสร้างหลักเป็น  $\beta$ -strands ซึ่งมีลักษณะคล้ายกับโปรตีนสร้างรูรั้วชนิด aerolysin จากข้อมูลเบื้องต้นของโครงสร้างสามมิติของ BinB แสดงให้เห็นว่าโปรตีน BinB ทำหน้าที่จับกับตัวรับจำเพาะและอาจช่วยส่งผ่านโปรตีน BinA หรือ BinA-BinB complex เข้าสู่เซลล์และทำลายเซลล์ต่อไป

### Abstract

**Project Code:** RMU5380002  
**Project Title:** Elucidating the structure and function of the binary toxin from *Bacillus sphaericus*  
**Investigator:** Assistant Professor Panadda Boonserm  
Institute of Molecular Biosciences, Mahidol University  
**E-mail Address:** panadda.boo@mahidol.ac.th  
**Project Period:** 3 years

The binary toxin produced from *Bacillus sphaericus* is highly toxic against mosquito larvae. The two major components of the binary toxin are 42-kDa BinA and 51-kDa BinB. BinA is proposed to function as a toxic subunit, whereas BinB is responsible for receptor binding. So far, there is no detailed knowledge of the molecular mechanism of the binary toxin, mainly due to the lack of structural information. In the absence of the structural information, we investigated the role of amino acids at the N-terminal region of BinB in governing the larvicidal activity via amino acid substitutions at residues spanning positions 35-37 and 41-43. Bioassays, receptor and membrane binding analyses demonstrated that residues P35, F41 and Y42 of BinB are crucial for the larvicidal activity, especially during the steps of membrane and receptor binding. In order to identify functional sites of BinA, aromatic cluster in BinA at positions Y213, Y214, Y215, W222 and W226 were substituted by leucine. All mutants were able to insert into lipid monolayers as observed by Langmuir–Blodgett trough and could permeabilize the liposomes in a similar manner as the wild type. However, mosquito-larvicidal activity was abolished for W222L and W226L mutants suggesting that tryptophan residues at both positions play an important role in the toxicity of BinA, possibly involved in the cytopathological process after toxin entry into the cells.

In order to gain more insight into the molecular mechanism of the binary toxin, the X-ray crystallographic analysis was performed. Only the crystal of activated BinB could diffract to 1.75 Å resolution. The structure of activated BinB has been determined by single-wavelength anomalous dispersion (SAD) method. The structure of activated BinB is composed of two domains: an N-terminal  $\beta$ -trefoil lectin-like domain and an elongated C-terminal domain. The N-terminal domain shares similar features to the sugar binding proteins or lectins. The C-terminal domain resembles the pore-forming domain of the aerolysin-type  $\beta$ -pore forming toxins. Taken together, the crystal structure of the BinB subunit confirms the important role of BinB for receptor binding and possibly facilitating the internalization of the BinA or BinA-BinB complex into the cells to exert its cytotoxicity. However, the functional detail of BinB protein requires further elucidation.

**Keywords:** binary toxin, immunohistochemistry, receptor binding, site-directed mutagenesis, larvicidal activity, X-ray crystallography