



Role of Mosquito Alpha-glucosidase in the Larvicidal Activity of *Bacillus sphaericus*

Dumrongkiet Arthan

Department of Tropical Nutrition and Food Science, Faculty of Tropical Medicine,
Mahidol University, 420/6 Ratchawithi Road, Bangkok 10400, Thailand

Abstract

Bacteria harmless to mammals and other insects have been proposed as a mosquito larvicide. *Bacillus sphaericus* is safe and can kill mosquito larvae by producing binary toxin (Bin). The mechanism of Bin against larvae is unclear; the protoxins (BinA and BinB) are activated by endogenous serine proteases to form active toxins. BinA and BinB form protein complexes with glycosylphosphatidylinositol membrane bound alpha-glucosidase, which acts as a receptor in *Culex pipiens* (Cpm1), *Culex quinquefasciatus* (Cqm1), and *Anopheles gambiae* (Agm3) larvae. Since alpha-glucosidases play important roles in mosquitoes, we describe the biochemical properties, and roles of alpha-glucosidase, including the digestion of sugar and the effect of Binary toxin on mosquito larvae. Transposable-element like DNA insertion into the coding sequence, which induces a new mRNA splicing event, or a nonsense mutation found in an alpha-glucosidase gene, is evidently associated with resistance of mosquitoes to the toxicity of *B. sphaericus*. Understanding alpha-glucosidase, which acts as a receptor for *B. sphaericus* producing-binary toxin, is essential for microbial larvicide development.

Keywords: alpha-glucosidase, *Bacillus sphaericus*, Binary toxin, mosquito

บทนำ

จากรายงานผลการสำรวจพบว่าทั่วโลกมียุงอยู่ประมาณ 3,500 ชนิด ยุงก่อให้เกิดความรำคาญโดยการดูดกินเลือดของมนุษย์และสัตว์เป็นอาหาร รวมทั้งเป็นพาหะนำโรคร้ายแรงหลายชนิด ยุงรำคาญ (*Culex quinquefasciatus*) เป็นพาหะนำเชื้อไวรัส Japanese encephalitis สาเหตุโรคไข้สมองอักเสบ และเป็นพาหะนำเชื้อพยาธิตัวกลมที่มีลักษณะคล้ายเส้นด้ายซึ่งเป็นสาเหตุของโรคเท้าช้าง ยุงรำคาญ (*Cx. pipiens*) เป็นพาหะนำเชื้อไวรัสเวสต์ไนล์ ทำให้เกิดโรคไข้สมองอักเสบเวสต์ไนล์ ยุงก้นปล่อง (*Anopheles minimus* และ *An. dirus*) เป็นพาหะนำเชื้อพลาสโมเดียมทำให้เกิดโรคมาลาเรีย ยุงลาย (*Aedes aegypti* และ *Ae.*

albopictus) เป็นพาหะนำเชื้อไวรัสเดงกี ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคไข้เลือดออก โรคระบาดเหล่านี้เป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของโลกในปัจจุบัน การควบคุมการระบาดของวิธีหนึ่งคือการกำจัดยุงพาหะนำโรค โดยใช้สารเคมีกำจัดยุงโดยตรง เช่น การใช้สาร Pyrethroid ในการควบคุมจำนวนยุงลาย ซึ่งเป็นวิธีที่ทำได้ง่าย และเห็นผลเร็ว แต่ก็ให้ผลเพียงช่วงเวลาสั้นๆ อย่างไรก็ตามสารเคมีที่ใช้ยังมีราคาแพงและเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆ รวมถึงสิ่งแวดล้อม นอกจากนี้การใช้สารเคมีอย่างไม่ถูกต้องจะก่อให้เกิดยุงที่ดื้อต่อสารเคมีขึ้น [1,2] ในขณะที่การใช้แบคทีเรียในการกำจัดยุงเพื่อควบคุมจำนวนยุงเป็นวิธีที่ไม่ทำลายสิ่งแวดล้อม โดย *Bacillus sphaericus* เป็นแบคทีเรียชนิดหนึ่งที่ไม่มีความเป็นพิษต่อมนุษย์และแมลงชนิดอื่น และสามารถนำลูกน้ำยุงในจิ้งนีส *Culex* และ *Anopheles* ได้แต่ไม่เป็นพิษต่อยุงในจิ้งนีส *Aedes* [3] *B. sphaericus* จะสร้างโปรตีนทอกซิน Binary toxin (Bin) ซึ่งเป็นพิษต่อลูกน้ำยุง ถึงแม้ว่ากลไกในความเป็นพิษยังไม่

Correspondence:

Dumrongkiet Arthan,
Email: <tedat@mahidol.ac.th>

เป็นที่ทราบมานานแล้ว แต่มีหลักฐานอย่างชัดเจนว่า โปรตีนทอกซิน Bin จับแบบจำเพาะกับรีเซปเตอร์ซึ่งเป็นเอนไซม์แอลฟา กลูโคซิเดสที่ยึดติดบนผิวเยื่อหุ้มเซลล์ epithelial ของกระเพาะอาหาร ความเป็นพิษของโปรตีนทอกซิน Bin ขึ้นกับคุณสมบัติและจำนวนของแอลฟา กลูโคซิเดสรีเซปเตอร์ในยุงแต่ละชนิด [4-6] ในกลุ่มประชากรยุงที่ดื้อต่อ *B. sphaericus* พบว่ามีการผ่าเหล่าของรีเซปเตอร์เอนไซม์แอลฟา กลูโคซิเดส [4,7,8]

จากความสำคัญของแอลฟา กลูโคซิเดสรีเซปเตอร์ในยุงต่อความเป็นพิษของโปรตีนทอกซิน Bin ที่สร้างโดย *B. sphaericus* ดังที่ได้กล่าวมาแล้ว ในบทความนี้จะกล่าวถึงความสำคัญและคุณสมบัติทางชีวเคมี รวมถึงบทบาทของแอลฟา กลูโคซิเดสรีเซปเตอร์ในการฆ่าลูกน้ำยุงด้วยโปรตีนทอกซิน Bin จาก *B. sphaericus* และการผ่าเหล่าของยีนแอลฟา กลูโคซิเดสรีเซปเตอร์ในกลุ่มประชากรยุงที่สามารถต้านทานความเป็นพิษของ *B. sphaericus*

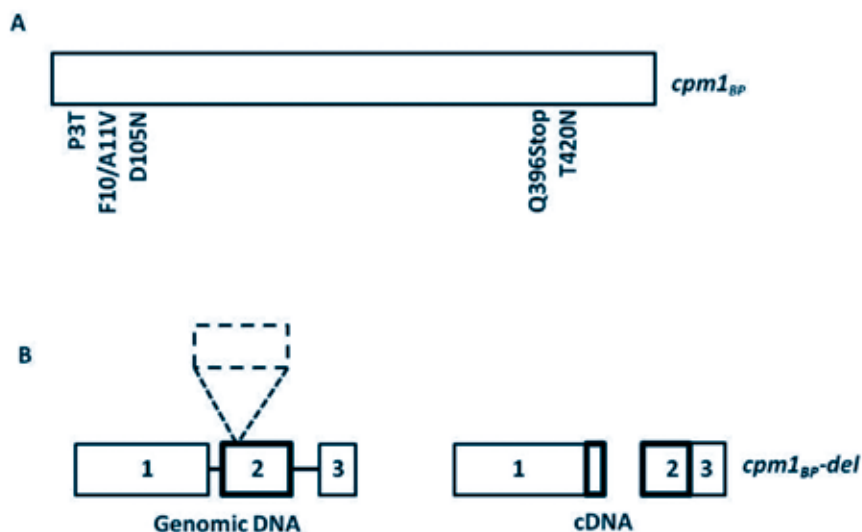
ความสำคัญและคุณสมบัติทางชีวเคมีของแอลฟา กลูโคซิเดสของยุง

แอลฟา กลูโคซิเดสในยุง (EC 3.2.1.20, α -glucosidase) เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยพันธะแอลฟา-กลูโคซิดิก (α -glucosidic bond) จากด้านปลาย non-reducing เพื่อปล่อยน้ำตาลกลูโคสจากสารตั้งต้น เอนไซม์ชนิดนี้จัดอยู่ในแฟมิลีที่ 13 ของ กลุ่มเอนไซม์ glycoside hydrolase [9,10] สารตั้งต้นธรรมชาติของแอลฟา กลูโคซิเดสโดยทั่วไปเป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่ เช่น ซูโครส (sucrose) มอลโทส (maltose) น้ำตาลสามโมเลกุล (maltotriose) น้ำตาลสี่โมเลกุล (maltotetraose) นอกจากนี้ยังสามารถย่อยสารตั้งต้นสังเคราะห์ได้ เช่น phenyl α -glucoside, *p*-nitrophenyl α -glucoside เอนไซม์ชนิดนี้มีความสำคัญต่อสิ่งมีชีวิตโดยเฉพาะอย่างยิ่งในแมลงที่ดูดกินน้ำหวานเป็นอาหาร เช่น แมลงหวี่ ผีเสื้อ และยุง เป็นต้น โดยทั่วไปแอลฟา กลูโคซิเดสของแมลงจะทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยน้ำตาลซูโครสเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวกลูโคสและฟรุคโตสเข้าสู่กระบวนการเมตาโบลิซึม เพื่อจะได้พลังงานสำหรับการดำรงชีวิต

ยุงตัวผู้และตัวเมียสามารถดำรงชีวิตอยู่ได้โดยการดูดกินน้ำหวานจากดอกไม้ ซึ่งส่วนประกอบโดยทั่วไปคือน้ำตาลซูโครสซึ่งยุงจะนำมาใช้เป็นแหล่งพลังงานในการดำรงชีวิตการบิน รวมถึงการสืบพันธุ์ จากการศึกษาที่ผ่านมา มีหลักฐานอย่างชัดเจนว่า ในตอมน้ำลายยุงมีแอลฟา กลูโคซิเดสซึ่งมีหน้าที่ช่วยย่อยน้ำตาลซูโครสซึ่งเป็นส่วนประกอบทั่วไปในน้ำหวานจากดอกไม้ที่ยุงดูดกิน จากการทดลองพบว่ายุงตัวเมียจะตายภายใน 6 วัน ถ้าได้รับเลือดเป็นอาหารเพียงอย่างเดียวโดยไม่ได้รับน้ำตาลในช่วงแรกหลังจากเปลี่ยนจากระยะดักแด้เป็นตัว ยุง ในยุง *An. aquasalis* วงจรชีวิตของยุงจะสั้นลงมาก ถ้า

ไม่ได้รับอาหารที่มีน้ำตาลในช่วงวันแรกหลังจากเปลี่ยนจากดักแด้เป็นตัว ยุง เนื่องจากในระยะดักแด้จะใช้น้ำตาลทั้งหมดเปลี่ยนเป็นแหล่งพลังงานในการดำรงชีวิต หลังจากที่ยุงเป็นตัว ยุงแล้วจะต้องหาน้ำตาลมาทดแทนเพื่อใช้สร้างพลังงาน โดยเร็ว ข้อมูลเหล่านี้พบว่ามีความสอดคล้องกับรายงานในยุงตัวเมียของ *An. gambiae* จะมีชีวิตอยู่ได้ยาวนานขึ้น ถ้าได้รับน้ำตาลเป็นอาหารในช่วงแรกของการเป็นตัว ยุง [11,12] โดยช่วงนี้ยุงจะสร้างเอนไซม์แอลฟา กลูโคซิเดสในปริมาณสูงเพื่อใช้ย่อยน้ำตาลซูโครสในน้ำหวานจากดอกไม้ เพื่อจะได้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวกลูโคสและฟรุคโตสเข้าสู่กระบวนการเมตาโบลิซึม จากรายงานที่ผ่านมาเป็นที่ยอมรับว่าการย่อยน้ำตาลน่าจะเกิดขึ้นที่ตอมน้ำลายของยุงก่อน ถึงแม้ว่าในปัจจุบันยังเป็นข้อโต้แย้งเกี่ยวกับการย่อยน้ำตาลด้วยแอลฟา กลูโคซิเดสว่าเกิดขึ้นที่อวัยวะส่วนใดของยุง ระหว่างตอมน้ำลาย (Salivary gland) กระเพาะกักเก็บอาหาร (Crop) หรือกระเพาะอาหาร (Midgut) ความเชื่อที่ว่าเกิดขึ้นในกระเพาะกักเก็บอาหารเนื่องจากเป็นแหล่งเก็บเอนไซม์แอลฟา กลูโคซิเดส แต่ก็ยังมีข้อสงสัยว่าไม่พบแอกติวิตีของแอลฟา กลูโคซิเดสในของกระเพาะกักเก็บอาหารของยุง *An. aquasalis* เช่นเดียวกับในแมลงบางชนิด [13,14] ในขณะที่สามารถตรวจพบแอลฟา กลูโคซิเดสได้ในกระเพาะอาหารของยุง นอกจากนี้ยังมีหลักฐานยืนยันว่าน้ำตาลซูโครสจากน้ำหวานของดอกไม้ จะถูกส่งไปเก็บไว้ในกระเพาะกักเก็บอาหารในยุง *An. darlingi* ก่อนจะถูกส่งไปที่กระเพาะอาหารภายในเวลาไม่กี่ชั่วโมงหลังจากที่ได้รับน้ำตาล แต่ไม่เคยมีรายงานถึงหน้าที่ของแอลฟา กลูโคซิเดสจากกระเพาะอาหาร (Midgut) เกี่ยวกับการย่อยน้ำตาลในยุงมาก่อน [15] การย่อยน้ำตาลเชื่อว่าน่าจะเกิดขึ้นในตอมน้ำลายมากกว่าจะเป็นอวัยวะอื่น เนื่องจากพบการแสดงออกของยีนแอลฟา กลูโคซิเดส Maltase-like I (*mal I*) ในตอมน้ำลายยุง *Ae. aegypti* และเมื่อวิเคราะห์ยีน *mal I* พบว่าแอลฟา กลูโคซิเดสมีน้ำหนักโมเลกุลที่คำนวณเท่ากับ 66.751 kDa และน่าจะมี N-linked glycoprotein 4 ตำแหน่งแสดงให้เห็นว่าแอลฟา กลูโคซิเดสอาจจะถูกหลั่งออกมาออกเซลล์ [16] จากการทำปฏิกิริยาบางส่วนของแอลฟา กลูโคซิเดสจากตอมน้ำลายยุงตัวเมีย *Ae. aegypti* พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 68 kDa และสามารถย่อยน้ำตาลซูโครสได้ [17] เช่นเดียวกับแอลฟา กลูโคซิเดสสามารถตรวจพบได้ในตอมน้ำลายของยุง *Ae. albopictus* มีน้ำหนักโมเลกุลขนาด 67 kDa [18] และ *An. darlingi* [19]

เมื่อเร็วๆ นี้ มีรายงานการทำแอลฟา กลูโคซิเดส 3 ไอโซไซม์ให้บริสุทธิ์บางส่วนจากยุง *An. aquasalis* คือ α -Glu1, α -Glu2 และ α -Glu3 เอนไซม์ทั้งหมดถูกสังเคราะห์โดยเซลล์ epithelial ในกระเพาะอาหารยุง โดยที่ α -Glu1 และ α -Glu2 พบได้ทั้งชนิดที่หลั่งออกมาออกเซลล์และชนิดที่ติดกับเยื่อหุ้มเซลล์ ในขณะที่ α -Glu3 พบเฉพาะชนิดที่ติดกับเยื่อหุ้มเซลล์ ทั้งหมดมีน้ำหนักโมเลกุลของหน่วยย่อย

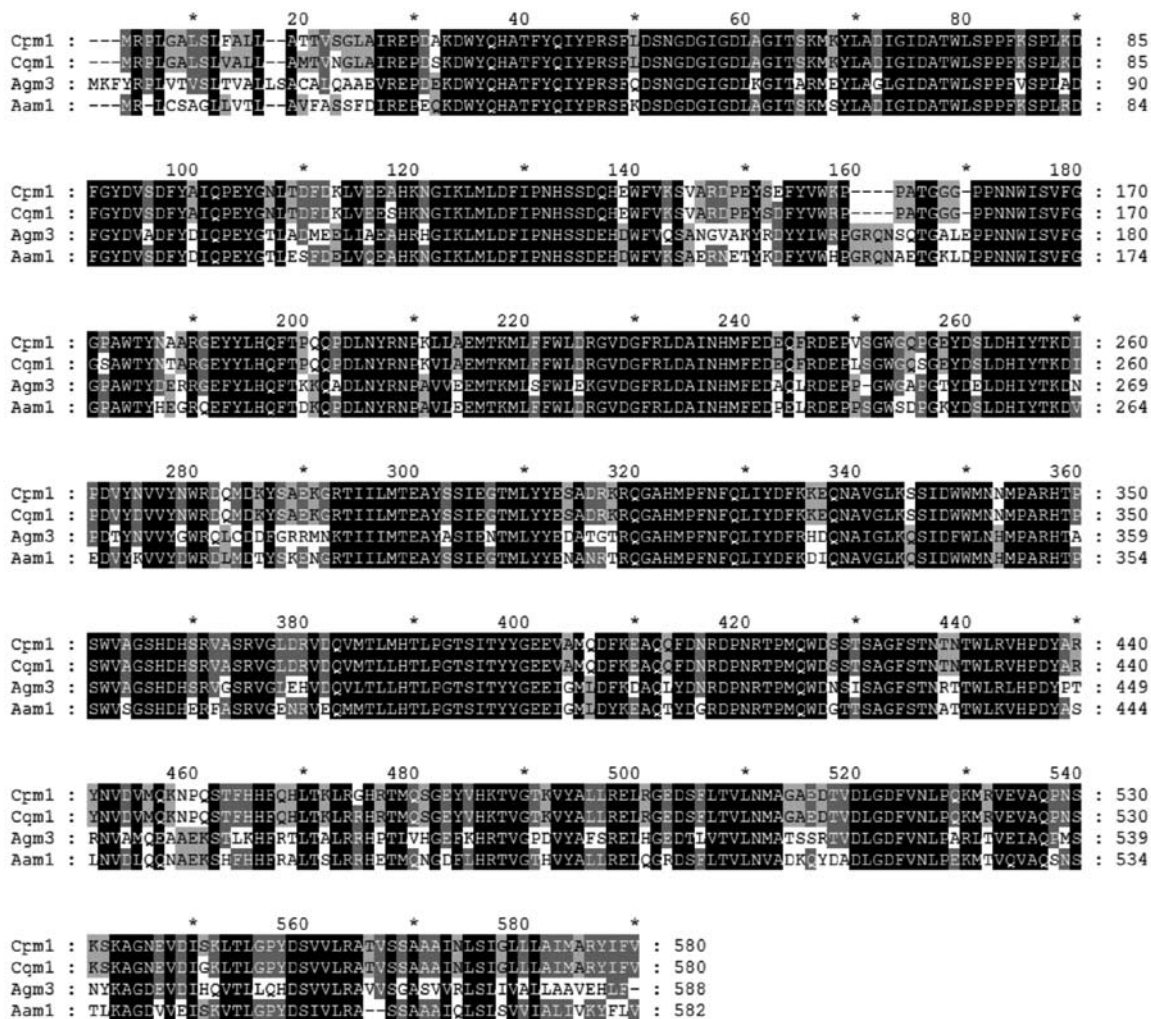


รูปที่ 1 การผ่าเหล่าในยีนแอลฟาไกลูโคซิเดส (*cpm1*) A. cDNA จาก *Culex pipiens* strain GEO ที่สามารถต้านทานความเป็นพิษของ *B. sphaericus* ที่มีการผ่าเหล่าที่ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโน 5 ชนิด รวมทั้ง nonsense mutation ที่ตำแหน่งของรหัสของกรดอะมิโนกลูตามีนส่งผลให้เปลี่ยนเป็นรหัสหยุดในยีนแอลฟาไกลูโคซิเดส (*cpm1*) และเรียกยีนที่มีการผ่าเหล่าชนิดนี้ว่า *cpm1_{BP}* (รูปนี้ดัดแปลงจาก Darboax และคณะ [8]) B. Genomic และ cDNA จากยุง *Cx. pipiens* ที่สามารถต้านทานความเป็นพิษ *B. sphaericus* ยีน *cpm1* ของยุงกลุ่มนี้พบว่ามี transposon-like element แทรกใน exon2 ของ genomic DNA ในลักษณะที่ไม่มีผลต่อการเคลื่อนย้ายลำดับกรดอะมิโนในแอลฟาไกลูโคซิเดสรีเซปเตอร์ แต่ทำให้เกิดตำแหน่งของ cryptic splice site ขึ้นบน exon2 หลังจากกระบวนการ mRNA splicing ที่ตำแหน่งดังกล่าว ทำให้ exon2 ขาดหายไปบางส่วน ส่งผลให้ mRNA ของแอลฟาไกลูโคซิเดสที่ได้นั้นลง (รูปนี้ดัดแปลงจาก Darboax และคณะ [8])

ขนาด 70 kDa [14] นอกจากนี้ได้มีการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนแอลฟาไกลูโคซิเดส 2 ชนิด คือ *agm1* และ *agm2* ในต่อมน้ำลายของ *An. gambiae* ซึ่งคล้ายกับ *mal I* และยังพบการแสดงออกของ *agm1* และ *agm2* ในกระเพาะอาหารของยุงรวมทั้งในอวัยวะอื่นด้วย [20] เนื่องจากโครงการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนทั้งหมด (Genome project) ของ *An. gambiae* เสร็จสิ้นแล้ว พบว่าได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแอลฟาไกลูโคซิเดส 3 ชนิดที่แตกต่าง โดย 2 ชนิดมีลำดับเบสที่เหมือนกับยีน *agm1* และ *agm2* ในต่อมน้ำลายของ *An. gambiae* [21] และยีน *agm3* มีความคล้ายคลึงกับยีน *cpm1* ซึ่งเป็นแอลฟาไกลูโคซิเดสรีเซปเตอร์ของโปรตีน binary toxin ซึ่งสร้างโดย *B. sphaericus* ที่ติดบนเยื่อหุ้มเซลล์ epithelial ของกระเพาะอาหารของลูกน้ำยุง *Cx. pipiens* หลังจากการแสดงออกของยีนนี้ในแบคทีเรียพบว่าโปรตีน Cpm1 ที่ได้นี้มีน้ำหนักโมเลกุลของหน่วยย่อยขนาด 60 kDa [5]

บทบาทของแอลฟาไกลูโคซิเดสในการฆ่าลูกน้ำยุงโดยโปรตีนทอกซินจากแบคทีเรีย *Bacillus sphaericus*

การใช้แบคทีเรียในการฆ่าลูกน้ำยุงเป็นวิธีหนึ่งในการควบคุมจำนวนประชากรยุง ซึ่งมีรายงานอย่างชัดเจนในการใช้ *B. sphaericus* โดยที่ไม่มีความเป็นพิษต่อมนุษย์และแมลงชนิดอื่น [3] *B. sphaericus* เป็นแบคทีเรียแกรมบวกเมื่ออยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสม จะสร้างผลึกโปรตีนทอกซิน binary toxin (Bin) ซึ่งเป็นพิษต่อลูกน้ำยุง *Cx. pipiens* ผลึกโปรตีนทอกซิน Bin จะย่อยโดยลูกน้ำยุงทำให้ได้โปรตีนทอกซินในรูปโปรทอกซิน (protoxin) ที่ละลายน้ำได้ 2 ชนิด คือ BinA และ BinB ที่มีน้ำหนักโมเลกุลขนาด 42 และ 51 kDa ตามลำดับ หลังจากถูกตัดด้วยเอนไซม์เซอรีนโปรตีเอส (serine protease) ของลูกน้ำยุงจะได้โปรตีนทอกซิน BinA และ BinB ที่สามารถทำงานได้ (active toxin) และมีน้ำหนักโมเลกุลขนาด 39 และ 43 kDa ตามลำดับ โดย BinB จะจับแบบจำเพาะกับแอลฟาไกลูโคซิเดสรีเซปเตอร์ Cpm1 ซึ่งยึดติดบนผิวเยื่อหุ้มเซลล์ epithelial ของกระเพาะอาหารด้วย glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor [3,5] จากนั้น BinA จะจับกับ BinB ที่จับอยู่กับแอลฟาไกลูโคซิเดสรีเซปเตอร์ ทำให้เกิดโปรตีนเชิงซ้อนระหว่างโปรตีนทั้งสามชนิด อย่างไรก็ตามกลไกการฆ่าลูกน้ำยุงหลังจากการเกิดโปรตีนเชิงซ้อนนี้ มีสมมุติฐานว่าโปรตีนทอกซินอาจจะทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เป็นรูรั่ว แต่ก็ยังไม่มีหลักฐานเป็นที่แน่ชัด [22,23] นอกจากนี้ยังพบกลไก



รูปที่ 2 การทำ Alignment เพื่อเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของแอลฟาไกลูโคซิเดสจากยุงชนิดต่างๆ คือ Cpm1 (Accession no. AAL05443: *Culex pipiens*), Cqm1 (Accession no. ABC59609: *Cx. quinquefasciatus*), Agm3 (Accession no. ABW98683: *Anopheles gambiae*) และ Aam1 (Accession no. XP_001660909: *Aedes aegypti*)

แบบเดียวกันของการฆ่าลูกน้ำยุง *Cx. pipiens* ด้วย *B. sphaericus* ในยุงในจีนัส *Culex* และ *Anopheles* แต่ไม่สามารถฆ่าลูกน้ำยุงในจีนัส *Aedes* ยังพบว่าโปรตีนทอกซิน Bin สามารถจับกับแอลฟาไกลูโคซิเดสรีเซปเตอร์ Cqm1 และ Agm3 ของยุง *Cx. quinquefasciatus* [24] และ *An. gambiae* [25] ตามลำดับ ในขณะที่โปรตีนทอกซิน Bin ไม่สามารถจับกับแอลฟาไกลูโคซิเดสรีเซปเตอร์ Aam1 ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลขนาด 73 kDa ของยุง *Ae. aegypti* [6] การทำ Alignment เพื่อเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของแอลฟาไกลูโคซิเดสรีเซปเตอร์จากยุงชนิดต่างๆ คือ Aam1 (Accession no. XP_001660909: *Ae. aegypti*), Cpm1 (Accession no. AAL05443: *Cx. pipiens*), Cqm1

(Accession no. ABC59609: *Cx. quinquefasciatus*), และ Agm3 (Accession no. ABW98683: *An. gambiae*) พบว่าลำดับของกรดอะมิโนที่เหมือนกัน (sequence identity) ระหว่างแอลฟาไกลูโคซิเดสรีเซปเตอร์ Cpm1 กับ Cqm1, Agm3 และ Aam1 เท่ากับ 97, 66 และ 74% ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 2 ซึ่งแสดงให้เห็นถึงโปรตีนที่มาจากวิวัฒนาการเดียวกันและมีหน้าที่คล้ายกัน

เนื่องจาก *B. sphaericus* สามารถฆ่าลูกน้ำยุงในจีนัส *Culex* และ *Anopheles* โดยมีประสิทธิภาพการฆ่ายุงโดยโปรตีนทอกซิน ซึ่งขึ้นอยู่กับคุณสมบัติและปริมาณของรีเซปเตอร์ที่แสดงออกบนผิวของเยื่อหุ้มเซลล์ นอกจากนี้ยังพบ

ว่าการผ่าเหล่าของแอลฟาไกลูโคซิเดสรีเซปเตอร์สัมพันธ์กับการต้านทานความเป็นพิษของ *B. sphaericus* จากผลการศึกษาในยุง *Cx. pipiens* strain GEO พบว่าสามารถต้านทานความเป็นพิษของ *B. sphaericus* ได้ นอกจากการผ่าเหล่าที่ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโน 5 ชนิด และยังมี nonsense mutation ที่ตำแหน่งของรหัสของกรดอะมิโนในลำดับที่ส่งผลให้เปลี่ยนแปลงเป็นรหัสหยุดในยีนแอลฟาไกลูโคซิเดส *cpm1* ทำให้เกิดการหยุดกระบวนการแปลรหัส (translation) ก่อนจะได้โปรตีนที่สมบูรณ์ ส่งผลให้ได้แอลฟาไกลูโคซิเดสที่ผิดปกติโดยมีจำนวนกรดอะมิโนสั้นลง 184 ตัว ในบริเวณที่ยึดจับกับ GPI anchor ทำให้จำนวนของแอลฟาไกลูโคซิเดสรีเซปเตอร์ที่อยู่บนผิวเซลล์น้อยลงเนื่องจากไม่สามารถยึดติดกับ GPI anchor ได้ แต่จะถูกหลั่งในช่องว่างระหว่างเซลล์ (extracellular space) แทน และเรียกยีนที่มีการผ่าเหล่าชนิดนี้ว่า *cpm1^{BP}* ดังรูป 1A [7,22] นอกจากนี้จากการเก็บตัวอย่างยุงจากภาคสนามของ *Cx. pipiens* ที่สามารถต้านทานความเป็นพิษ *B. sphaericus* เมื่อได้ตรวจสอบยีน *cpm1* ของยุงกลุ่มนี้ พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ transposonแทรกในบริเวณ exon2 ในลักษณะที่ไม่มีผลต่อการเคลื่อนของลำดับกรดอะมิโนในแอลฟาไกลูโคซิเดสรีเซปเตอร์ แต่ทำให้เกิดตำแหน่งของ cryptic splice site ขึ้นบน exon2 หลังจากกระบวนการ mRNA splicing ที่ตำแหน่งดังกล่าวทำให้ exon2 ขาดหายไปบางส่วน ส่งผลให้ mRNA ของแอลฟาไกลูโคซิเดสที่ได้สั้นลง ดังรูปที่ 1B เมื่อ mRNA ชนิดนี้ถูกแปลรหัส จะได้แอลฟาไกลูโคซิเดสที่สั้นลง โดยมีคุณสมบัติที่สามารถยึดติดกับ GPI anchor ได้ แต่ไม่มีแอคติวิตีของเอนไซม์และไม่สามารถจับกับโปรตีนทอกซิน Bin ได้ และเรียกยีนที่มีการผ่าเหล่าชนิดนี้ว่า *cpm_{IBP}-del* [8]

สรุป

การควบคุมประชากรของยุงซึ่งเป็นพาหะนำโรคร้ายแรงหลายชนิด สามารถทำได้โดยใช้แบคทีเรียที่ไม่เป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น แต่สามารถฆ่ายุงได้ คือ *B. sphaericus* โดยการผลิตโปรตีนทอกซิน binary toxin (Bin) ซึ่งใช้ฆ่าลูกน้ำยุงได้ *B. sphaericus* จะสร้าง toxin ในรูปของผลิตภัณฑ์โปรตีน protoxin แต่ยังไม่สามารถทำหน้าที่ได้ หลังจากถูกตัดด้วยเอนไซม์โปรตีเอสในลูกน้ำยุง ทำให้ได้โปรตีนทอกซิน Bin ในรูปที่สามารถทำงานได้ (active form) โปรตีน Bin มีสองชนิดคือ Bin A และ Bin B ที่สามารถเกิดโปรตีนเชิงซ้อนกับแอลฟาไกลูโคซิเดสรีเซปเตอร์ ซึ่งยึดติดบนผิวเยื่อหุ้มเซลล์ epithelial ของกระเพาะอาหารด้วย glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor ได้ อย่างไรก็ตามกลไกความเป็นพิษของโปรตีนทอกซิน Bin ต่อลูกน้ำยุงหลังจากการเกิดโปรตีนเชิงซ้อนนี้ มีสมมุติฐานว่าโปรตีนทอกซินอาจจะทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เป็นรูรั่ว แต่ก็ยังไม่มีความชัดเจนเป็นที่ยอมรับ นอกจากนี้ยังพบกลไกแบบเดียวกันของการฆ่าลูกน้ำยุง *Cx. pipiens* โดย *B. sphaericus* ในยุง *Cx. quinquefasciatus*

และ *An. gambiae* แต่ไม่สามารถฆ่าลูกน้ำยุง *Ae. aegypti* เนื่องจากโปรตีนทอกซิน Bin ไม่สามารถจับกับแอลฟาไกลูโคซิเดสรีเซปเตอร์ของยุง *Ae. aegypti* ได้ การผ่าเหล่าของแอลฟาไกลูโคซิเดสรีเซปเตอร์มีความสัมพันธ์กับการต้านทานความเป็นพิษของ *B. sphaericus* ของยุง โดยพบว่า nonsense mutation หรือการแทรกของ transposon ทำให้บางส่วนของยีนขาดหายไป ส่งผลให้แอลฟาไกลูโคซิเดสรีเซปเตอร์ไม่สามารถทำหน้าที่ได้ นอกจากนี้แอลฟาไกลูโคซิเดสในค่อมน้ำลายยุงทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยน้ำตาลซูโครสที่เป็นส่วนประกอบทั่วไปในน้ำหวานจากดอกไม้ที่ยุงดูดกิน ให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวกลูโคสและฟรุคโตสเพื่อเข้าสู่กระบวนการเมตาบอลิซึม เพื่อให้ได้พลังงานไปใช้ในการดำรงชีวิตของยุง ความเข้าใจในชีววิทยาระดับโมเลกุล และคุณสมบัติทางชีวเคมีของแอลฟาไกลูโคซิเดสรีเซปเตอร์ จะช่วยให้เกิดการพัฒนาและปรับปรุงการควบคุมจำนวนประชากรยุงโดย *B. sphaericus* ต่อไปในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

1. Chareonviriyaphap T, Rongnoparut P, Chantarumporn P, Bangs MJ. Biochemical detection of pyrethroid resistance mechanisms in *Anopheles minimus* in Thailand. J Vector Ecol. 2003;28:108-16.
2. Liu N, Xu Q, Zhu F, Zhang L. Pyrethroid resistance in mosquitoes. Insect Sci. 2006;13:159-66.
3. Charles JF, Nielsen-LeRoux C, Delecluse A. *Bacillus sphaericus* toxins: molecular biology and mode of action. Annu Rev Entomol. 1996;41:451-72.
4. Amorim LB, de Barros RA, Chalegre KD, de Oliveira CM, Regis LN, Silva-Filha MH. Stability of *Culex quinquefasciatus* resistance to *Bacillus sphaericus* evaluated by molecular tools. Insect Biochem Mol Biol. 2010;40:311-6.
5. Darboux I, Nielsen-LeRoux C, Charles JF, Pauron D. The receptor of *Bacillus sphaericus* binary toxin in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) midgut: molecular cloning and expression. Insect Biochem Mol Biol. 2001;31:981-90.
6. Ferreira LM, Romão TP, de-Melo-Neto OP, Silva-Filha MH. The orthologue to the Cpm1/Cqm1 receptor in *Aedes aegypti* is expressed as a midgut GPI-anchored α -glucosidase, which does not bind to the insecticidal binary toxin. Insect Biochem Mol Biol. 2010;40:604-10.

7. Darboux I, Pauchet Y, Castella C, Silva-Filha MH, Nielsen-LeRoux C, Charles JF, *et al.* Loss of the membrane anchor of the target receptor is a mechanism of bioinsecticide resistance. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002;99:5830-5.
8. Darboux I, Charles JF, Pauchet Y, Warot S, Pauron D. Transposon-mediated resistance to *Bacillus sphaericus* in a field-evolved population of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *Cell Microbiol*. 2007;9:2022-9.
9. Henrissat B, Bairoch A. New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem J*. 1993;293:781-8.
10. Henrissat B, Davies G. Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. *Curr Opin Struct Biol*. 1997;7:637-44.
11. Day JF, Edman JD, Scott TW. Reproductive fitness and survivorship of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) maintained on blood, with field observations from Thailand. *J Med Entomol*. 1994;31:611-7.
12. Gary RE, Foster WA. Effects of available sugar on the reproductive fitness and vectorial capacity of the malaria vector *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol*. 2001;38:22-8.
13. Dillon RJ, el Kordy E. Carbohydrate digestion in sandflies: α -glucosidase activity in the midgut of *Phlebotomus langeroni*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 1997;116:35-40.
14. Souza-Neto JA, Machado FP, Lima JB, Valle D, Ribolla PE. Sugar digestion in mosquitoes: identification and characterization of three midgut alpha-glucosidases of the neo-tropical malaria vector *Anopheles aquasalis* (Diptera: Culicidae). *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2007;147:993-1000.
15. Okuda K, Caroci A, Ribolla P, Marinotti O, de Bianchi AG, Bijovsky AT. Morphological and enzymatic analysis of the midgut of *Anopheles darlingi* during blood digestion. *J Insect Physiol*. 2005;51:769-76.
16. James AA, Blackmer K, Racioppi JV. A salivary gland-specific, maltase-like gene of the vector mosquito, *Aedes aegypti*. *Gene*. 1989;75:73-83.
17. Marinotti O, James AA. An α -glucosidase in the salivary gland of the vector mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Biochem*. 1990;20:619-23.
18. Marinotti O, de Brito M, Moreira CK. Apyrase and alpha-glucosidase in the salivary glands of *Aedes albopictus*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 1996;113:675-9.
19. Moreira-Ferro CK, Marinotti O, Bijovsky AT. Morphological and biochemical analyses of the salivary glands of the malaria vector, *Anopheles darlingi*. *Tissue Cell*. 1999;31:264-73.
20. Zheng L, Whang LH, Kumar V, Kafatos FC. Two genes encoding midgut-specific maltase-like polypeptides from *Anopheles gambiae*. *Exp Parasitol*. 1995;81:272-83.
21. Holt RA, Subramanian GM, Halpern A, Sutton GG, Charlab R, Nusskern, DR, *et al.* The genome sequence of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Science* 2002;298:129-49.
22. Pauchet Y, Luton F, Castella C, Charles JF, Romey G, Pauron D. Effects of a mosquitocidal toxin on a mammalian epithelial cell line expressing its target receptor. *Cell Microbiol*. 2005;7:1335-44.
23. Boonserm P, Moonsom S, Boonchoy C, Promdonkoy B, Parthasarathy K, Torres J. Association of the components of the binary toxin from *Bacillus sphaericus* in solution and with model lipid bilayers. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;342:1273-8.
24. Romão TP, de Melo Chalegre KD, Key S, Ayres CF, Fontes de Oliveira CM, de-Melo-Neto OP, *et al.* A second independent resistance mechanism to *Bacillus sphaericus* binary toxin targets its alpha-glucosidase receptor in *Culex quinquefasciatus*. *FEBS J*. 2006;273:1556-68.
25. Opota O, Charles JF, Warot S, Pauron D, Darboux I. Identification and characterization of the receptor for the *Bacillus sphaericus* binary toxin in the malaria vector mosquito, *Anopheles gambiae*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 2008;149:419-27.