1. บทนำ

แม่พันธุ์กุ้งจากทะเลยังเป็นสิ่งที่จำเป็นสำหรับการเพาะเลี้ยงลูกกุ้งจึงจะได้ลูกกุ้งที่แข็งแรงและมีอัตราการรอดสูง ทั้งนี้เนื่องมาจากความรู้ต่างๆ เกี่ยวกับความต้องการในการดูแลแม่กุ้งที่เลี้ยงได้ยังมีไม่เพียงพอโดยเฉพาะโปรตีนต่างๆที่จำเป็นในสภาวะที่มีไข่ นอกจากนั้นการกระตุ้นให้เกิดกระบวนการ ovarian maturation ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดว่าโปรตีนใดมีส่วนเกี่ยวข้องและมีความสัมพันธกันอย่างไร จากการศึกษาการหักลบคลังยีนในรังไข่กุ้งแชบ๊วย (*Penaeus merguiensis*) เป็นการศึกษาที่พยายามค้นคว้าหาโปรตีนที่น่าจะมีส่วนในการพัฒนารังไข่กุ้งและได้ค้นพบยีนที่มีการแสดงออกปริมาณมากในรังไข่กุ้ง ตัวอย่างเช่น ยีน shrimp ovarian peritrophin (SOP) และจากการศึกษาพบว่าโปรตีน SOP จะมีปริมาณมากขึ้นโดยเฉพาะระยะแก่ที่สุดของไข่กุ้งที่มีปริมาณ SOP มากที่สุด (Loongyai *et al.*, 2007a) นอกจากนั้นยังมียีน thrombospondin (TSP) ยีน translationally controlled tumour protein (TCTP) (Loongyai *et al.*, 2007b) และ ยีน RPL10a ซึ่งมีรายงานว่าอาจมีส่วนช่วยในการ proliferation ของเนื้อเยื่อหนูที่ได้รับรังสี (Lee *et al.*, 2006) ผู้วิจัยจึงสนใจศึกษา ผล RPL10a ต่อการพัฒนาของรังไข่กุ้ง

Ribosomal Protein L10a (RPL10a, Csa-19, NEDD6) เป็นโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของ 60s subunit โปรตีนนี้จัดอยู่ใน L1P family ของ Ribosomal protein และอยู่ในส่วนของ cytoplasm ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ RPL10a มีความคล้ายกันมากในแต่ละสิ่งมีชีวิต พบว่าในคนและในหนูมีความคล้ายกันถึง 91% ดังนั้นยีนนี้น่าจะเป็นยีนที่มีความสำคัญในวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต จากการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนทำนายได้ว่าลำดับของกรดอะมิโนไม่มีส่วนที่เป็น hydrophobic leader sequence และ transmembrane domain ซึ่งทำให้สันนิษฐานได้ว่า RPL10a น่าจะเป็น intracellular มากกว่าที่จะถูกหลั่ง หรือเป็น membrane bound molecule นอกจากนี้ยังพบว่ามี motif RKRRK ซึ่งเป็น nuclear localization signal, lysine rich domain และ potential tyrosine kinase phosphorylation site อีกด้วย

การแสดงออกของ RPL10a ในหนูที่ mature พบว่ามีการแสดงออกสูงในเนื้อเยื่อ lymphoid ในขณะที่เนื้อเยื่อที่ไม่ใช่ lymphoid จะมีการแสดงออกที่ต่ำ ส่วนใน brain และ liver พบว่าการแสดงออกของ RPL10a จะถูกควบคุมในระหว่างการ development กล่าวคือจะมีการแสดงออกสูงในระยะที่เป็น embryo และจะแสดงออกต่ำสุดในช่วงที่เป็น adult ดังนั้นสันนิษฐานว่า RPL10a อาจจะมีบทบาทในระหว่าง embryogenesis ใน lymphoid tissue และ non-lymphoid tissue รวมทั้งใน adult ซึ่งแสดงออกใน lymphoid organ (Fisicaro *et al.*, 1995)

ใน thymus ของหนูพบว่า RPL10a ถูกควบคุมการแสดงออกให้ต่ำลงด้วย Cyclosporin-A ซึ่งเป็นยากดภูมิคุ้มกันที่ใช้กันอย่างกว้างขวางในการบำบัดเมื่อเกิดปฏิกิริยาที่ไม่ยอมรับเนื้อเยื่อที่ปลูกถ่าย นอกจากนี้ RPL10a ยังถูกจัดว่าเป็นยีนในคนที่มีการตอบสนองต่อรังสี (radiation-responsive human gene) เนื่องจาก RPL10a ถูกควบคุมให้แสดงออกต่ำลงเมื่อได้รับรังสี X และ fission neutron ยิ่งไปกว่านั้น RPL10a ยังเป็นยีนแรกที่เป็นยีนในเซลล์ของคนที่เป็นมะเร็งที่มีการตอบสนองต่อรังสี แล้วพบว่าการแสดงออกไม่ได้แสดงออกร่วมกับ p53, adenylate cyclase และ protein kinase C (Balcer-Kubiczek *et al.*, 1997) นอกจากนี้มีการทดลองในหนูไร้ขน โดยให้รังสี radio พบว่าในหนูที่โดนรังสีจะมี การแสดงออกของ RPL10a ที่สูงขึ้น (Lee *et al.*, 2006) ซึ่งสันนิษฐานว่ายีนนี้อาจมีส่วนช่วยในการ proliferation เนื่องจากหนูที่ได้รับรังสีนี้จะมีเนื้อเยื่อเกินมาอย่างผิดปกติ

มีรายงานว่าในยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ *yap1* null มีความทนต่อการเกิด oxidative stress เมื่อถูก transform ด้วยยีน RPL10a ที่ได้จากสาหร่ายสีเขียวเซลล์เดียว *Chlamydomonas reinhardtii* เนื่องจากมีการเพิ่มขึ้นของ carotenoid สันนิษฐานว่า RPL10a อาจจะไปกระตุ้นยีนที่สร้าง carotenoid (Ivarez *et al.*, 2000)

นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า RPL10a ถูกจัดว่าเป็น tumor antigen ที่ถูกจดจำโดย HLA-A26-restricted CTL อีกด้วย RPL10a แสดงออกในเซลล์มะเร็งทุกเซลล์ รวมทั้ง non-malignant cell line และเนื้อเยื่อปกติอีกด้วย อย่างไรก็ตามในเนื้อเยื่อปกตินั้นมีการแสดงออกที่ต่ำมาก (Koga *et al.*, 2003)

RPL10a มีปฏิสัมพันธ์กับ Trichosanthin (TCS) (Xia *et al.*, 2005) ซึ่งเป็น ribosome-inactivating protein (RIP) TCS ถูกใช้เพื่อหยุดการตั้งครรภ์ในช่วงต้นและยับยั้งการตอบสนองของภูมิคุ้มกัน ถึงแม้ว่าบทบาทที่แน่นอนของ RPL10a ในกระบวนการสังเคราะห์โปรตีนของ eukaryotic ยังไม่เป็นที่ทราบกันแน่ชัด แต่ก็สันนิษฐานได้ว่าปฏิสัมพันธ์ของ TCS และ RPL10a น่าจะเกี่ยวข้องกับ receptor site สำหรับ RIPs แล้วทำให้เกิดการบดบังในกระบวนการรวมตัวของ ribosome และการสังเคราะห์โปรตีน นอกจากนี้ยังพบว่า RPL10a มีปฏิสัมพันธ์กับ YWHAZ (14-3-3 zeta) อีกด้วย (Meek *et al.*, 2004) YWHAZ เป็นโปรตีนที่ควบคุม cell division cycle และ block cell cycle หลังจากการกระตุ้น DNA replication และ DNA damage checkpoint RPL10a จะจับกับ YWHAZ ในระยะ interphase ยิ่งไปกว่านั้นยังมีรายงานว่า RPL10a มีปฏิสัมพันธ์กับ MAP3K1 และ MAP3K14 ซึ่งพบว่าทั้งสามยีนคือ YWHAZ MAP3K1 และ MAP3K14 อยู่ใน TNF-α/NF-κB signal transduction pathway ทั้งสิ้น (Bouwmeester *et al.*, 2004) ดังนั้นมีความเป็นไปได้ว่า RPL10a อาจจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับ pathway นี้เช่นกัน

จากการศึกษาการแสดงออกของยีนในไข่ของกุ้งแชบ๊วย (*Fenneropenaeus merguiensis)* โดยวิธี Suppressive Subtractive Hybridization Technique (SHH) ได้พบกลุ่มของยีนที่มีการแสดงออกสูงในไข่กุ้งในระยะ vitellogenic stage เมื่อเปรียบเทียบกับ ยีนใน non-developed ovaries ที่มีการแสดงออกมาก 3-7 เท่า จำนวน 138 ยีน ยีน 2 ชนิดที่มีการแสดงออกสูงสุดได้นำมาศึกษารายละเอียดแล้ว ได้แก่ ยีน Shrimp Ovarian Peritrophin (SOP) ยีน SOP แสดงออกมากในระยะที่ 1 ของ vitellogenic stage และลดลงในระยะที่ 2 และ 3 ของ vitellogenic stage ตามลำดับในทางตรงกันข้ามปริมาณโปรตีน SOP พบมากที่สุดในระยะที่ 3 ของvitellogenic stage และพบว่า SOP มีส่วนในการป้องกัน Oocyte จาก Pathogen (Loongyai *et al.*, 2007a) ยีน Translational controlled tumour protein (TCTP) มีการแสดงออกมากที่สุดใน ระยะที่ 1 ของ vitelogenic stage และลดลงในระยะที่ 2 และที่ 3 ของ vitellogenic stage ตามลำดับ โปรตีน TCTP มีส่วนเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โปรตีนเนื่องจากการพบการเกาะกับ EF1α (Loongyai *et al.*, 2006) นอกจากนั้น TCTP ได้มีรายงานถึงหน้าที่ต่อการเร่งการเจริญของเซลล์ต่างๆ (Bohm *et al.*, 1989 ; Bommer *et al.*, 1994) นอกจากโปรตีนทั้งสองชนิดที่กล่าวมาแล้ว การทดลองจากห้องปฏิบัติการของผู้วิจัยได้พบยีน RPL10a อีกชนิดหนึ่งที่พบการแสดงออกสูงมากในไข่กุ้ง โปรตีน RPL10a มีรายงานถึงการมีส่วนในการเจริญเติบโตของ embryo (Fisicaro *et al.*, 1995) คณะผู้วิจัยจึงได้โคลนยีน RPL10a จากกุ้งเพื่อศึกษาหน้าที่ต่างๆของโปรตีน RPL10a ต่อเซลล์ไข่กุ้ง ดังนั้นโครงการนี้จึงสนใจที่จะผลิตโปรตีนลูกผสม RPL10a แล้วนำมาทดสอบผลที่มีต่อรังไข่กุ้งทั้งในขวดทดลองและในกุ้งมีชีวิตโดยดูการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องและ การพัฒนาของรังไข่