

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: BRG5480018

ชื่อโครงการ: การศึกษาคุณลักษณะและหน้าที่ของโปรตีนที่กระตุ้นการพัฒนารังไข่จากสมองและปมประสาทส่วนนอกของกิ้งกูดดำ

ชื่อนักวิจัย: อภินันท์ อุดมกิจ
สถาบันชีววิทยาศาสตร์ระดับโมเลกุล
มหาวิทยาลัยมหิดล ศาลายา
นครปฐม 73170

E-mail: apinunt.udo@mahidol.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: 31 สิงหาคม 2554 ถึง 30 สิงหาคม 2557

การสังเคราะห์ไวเทลโลจินินเป็นกระบวนการสำคัญสำหรับการพัฒนารังไข่ในกิ้ง เป็นที่ทราบกันว่าการสังเคราะห์ไวเทลโลจินินได้รับการกระตุ้นจากสารจากสมองและปมประสาทส่วนนอกของกิ้ง แต่ยังไม่มีการระบุถึงชนิดและลักษณะของสารดังกล่าว โครงการนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสารที่กระตุ้นการพัฒนารังไข่ (gonad-stimulating factors หรือ GSFs) ในกิ้งกูดดำ (*Penaeus monodon*) จากปมประสาทส่วนนอก ซึ่งพบว่าโปรตีนที่ได้จากการแยกบริสุทธิ์ด้วย anion-exchange and lectin-affinity โครมาโตกราฟี สามารถกระตุ้นการเจริญของเซลล์ไข่ได้ บ่งบอกว่าโปรตีนที่กระตุ้นการพัฒนารังไข่นี้เป็นไกลโคโปรตีน นอกจากนี้ยังได้ตรวจสอบสมมติฐานของการยับยั้งการหลั่ง GSFs จากสมองและปมประสาทส่วนนอกโดยฮอร์โมนยับยั้งการพัฒนารังไข่ (gonad-inhibiting hormone หรือ GIH) โดยการแช่ชิ้นส่วนของรังไข่ร่วมกับชิ้นปมประสาทส่วนนอกในอาหารที่มีสาร calcium ionophore ซึ่งเป็นสารที่กระตุ้นให้เกิดการหลั่งของ GSFs จากปมประสาทส่วนนอก และเติมโปรตีนลูกผสม GIH (rGIH) ลงไปด้วย ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า rGIH ไม่ได้ส่งผลกระทบต่ออาการหลั่งของ GSFs จากปมประสาทส่วนนอกโดย calcium ionophore นอกจากนี้ยังพบว่า rGIH อาจจะเหนี่ยวนำให้เกิดการเจริญเติบโตของเซลล์ไข่ได้ ซึ่งแสดงให้เห็นว่านอกจากหน้าที่ในการยับยั้งกระบวนการสร้างไวเทลโลจินินแล้ว GIH อาจทำหน้าที่ในการกระตุ้นการเจริญของเซลล์ไข่ในระยะแรกได้อีกด้วย นอกจากนี้ยังได้โคลน cDNA ที่สร้างโปรตีน Bursicon (PmBurs) ซึ่งเป็นไกลโคโปรตีนที่มีโครงสร้างคล้ายคลึงกับโครงสร้างของ gonadotropins ของ vertebrate จากกิ้งกูดดำได้สำเร็จ PmBurs ประกอบด้วยหน่วยย่อยสองหน่วยได้แก่ Bursicon- α (PmBurs α) และ Bursicon- β (PmBurs β) ซึ่งพบว่ามีแสดงออกมากในขั้นตอนของการพัฒนารังไข่

ระยะแรกก่อนที่จะมีการสร้างไวเทลโลจีนิน (ระยะ previtellogenic) ได้ทำการแสดงออกโปรตีนลูกผสม PmBurs α และ PmBurs β ในยีสต์ *Pichia pastoris* ในรูปที่เป็น homodimeric ของหน่วย α (PmBurs $\alpha\alpha$) หรือหน่วย β (PmBurs $\beta\beta$) และ heterodimeric ระหว่างหน่วย α และ β (PmBurs $\alpha\beta$) ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า homodimeric PmBurs $\alpha\alpha$ มีบทบาทในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์ไข่ในระยะต้นก่อนที่จะมีการสร้างไวเทลโลจีนิน ในทางตรงกันข้าม heterodimeric PmBurs $\alpha\beta$ สามารถกระตุ้นการแสดงออกของไวเทลโลจีนินในเซลล์ไข่ได้ ซึ่งผลการวิจัยทั้งหมดนี้บ่งบอกว่าโปรตีน Bursicon (PmBurs) เป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่ในการกระตุ้นการพัฒนารังไข่ในกิ้งกูดดำ

คำสำคัญ gonad-stimulating hormone การพัฒนารังไข่ การวางไข่ กิ้ง

Abstract

Project Code: BRG5480018

Project Title: Molecular characterization and functional study of gonad-stimulating factors in brain and thoracic ganglia of the black tiger shrimp

Investigator: Assoc. Prof. ApinuntUdomkit
Institute of Molecular Biosciences
Mahidol University, Salaya Campus
Nakhon Pathom 73170

E-mail Address: apinunt.udo@mahidol.ac.th

Project Period: 31 August 2011 – 30 August 2014

Vitellogenin synthesis is an essential process required for ovarian maturation in crustaceans. The synthesis of vitellogenin is known to be stimulated by substances from brain and thoracic ganglia, but no such factors have been identified to date. This project is designed to identify a gonad stimulating factor(s) (GSFs) in the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). A gonad-stimulating activity in the thoracic ganglia resided in the purified fraction from a serial purification by anion-exchange and lectin-affinity chromatography, suggesting that the protein that is responsible for this activity is a glycoprotein. In addition, a hypothesis that the release of GSFs from brain and thoracic ganglia is inhibited by a gonad-inhibiting hormone (GIH) was verified. The purified recombinant GIH (rGIH) was used to treat the ovarian explants that were co-cultured with thoracic ganglia explants in the presence of calcium ionophore, a substance that is known to stimulate the release of GSFs from thoracic ganglia. Our result, demonstrated that rGIH did not affect the release of GSFs from thoracic ganglia by calcium ionophore. Interestingly, the presence of rGIH seemed to induce oocyte growth and may suggest the dual function of GIH in ovarian maturation. Another attempt to identify a candidate for gonad-stimulating factor of *P. monodon* was achieved by molecular cloning of a cDNA encoding Bursicon (PmBurs), a member of glycoprotein hormone family based upon the structural similarity to vertebrate ganodotropins. PmBurs is composed of α and β subunits. Both Bursicon- α (PmBurs α) and Bursicon- β (PmBurs β) were highly expressed at previtellogenic stage of ovarian development. Recombinant PmBurs α and PmBurs β were expressed, either individually or together, in *Pichia pastoris*. Functional study

showed that the homodimeric PmBursaa played a role in stimulate oocyte growth in the early phase of vitellogenesis. In contrast, only the heterodimeric form of Bursicon (PmBurs $\alpha\beta$), but not homodimeric PmBurs α or PmBurs β alone, could significantly induce vitellogenin expression in the primary culture of ovarian cells. Our results therefore suggest a potential gonad-stimulatory function of PmBurs in the shrimp.

Keywords Gonad-stimulating hormone; ovarian maturation; spawning; shrimp