

Thesis Title	Hormonal Regulation of Trehalase Gene Expression, Trehalase Activity and Trehalase Inhibitor in the Bamboo Borer (<i>Omphisa fuscidentalis</i>) and Trehalase Inhibitor in the Silkworm (<i>Bombyx mori</i>)	
Author	Miss Nujira Tatun	
Degree	Doctor of Philosophy (Biology)	
Thesis Advisory Committee	Assoc. Prof. Dr. Tippawan Singtripop	Chairperson
	Prof. Dr. Sho Sakurai	Member
	Assoc. Prof. Somsak Wanichacheewa	Member

Abstract

Diapausing larvae of the bamboo borer *Omphisa fuscidentalis* contain soluble and membrane-bound trehalase in the midgut. Soluble trehalase activity accounts for three-fourths of the total trehalase activity in midgut homogenates. An exposure of diapausing larvae to juvenile hormone analog (JHA) induced pupation, accompanied by an increase in soluble trehalase activity at the beginning of the prepupal period. Injection of 20-hydroxyecdysone (20E) increased the level of soluble trehalase activity 5 days postinjection in a dose-dependent manner. In contrast, no increase in membrane-bound trehalase activity was observed under the same conditions. The cDNAs encoding the soluble and membrane-bound forms of trehalase in *O. fuscidentalis*, as respectively named, *trehalase-1* (*OfTreh-1*) and *trehalase-2* (*OfTreh-2*), were cloned. *Treh-1* encodes a 581-aa protein while *Treh-2* encodes a 648-aa protein with one putative transmembrane domain near the C-terminus. The mRNA expression level of *Treh-1* was 27-fold higher

than that of *Treh-2* in diapausing larval midgut. Following the exposure of diapausing larvae to JHA, *Treh-1* mRNA expression increased gradually until the onset of prepupal period whereupon it increased dramatically; in contrast, the mRNA expression of *Treh-2* remained at its initial level. Similarly, 20E upregulated *Treh-1* expression but had no effect on *Treh-2* expression. Taken together, these results suggest that an increase in the soluble trehalase activity at pupation is caused by upregulation of *Treh-1* gene. Moreover, membrane-bound trehalase does not appear to be involved in the dynamic changes in the hemolymph trehalose concentration that occur during the larval–pupal transformation.

The midgut of the silkworm *Bombyx mori* contains two types of trehalase: soluble and membrane-bound trehalase. Trehalose concentration in larval hemolymph remains substantially high through the feeding period of the last (fifth) larval instar, despite appreciable trehalase activity through this period. *B. mori* larval hemolymph contains two types of trehalase inhibitor, a proteinaceous inhibitor (inhibitor-P) and a non-proteinaceous inhibitor that is extractable with methanol and ethanol (inhibitor-M). Both inhibit the two types of trehalase with different effectiveness. Inhibitor-P inhibited soluble trehalase more effectively than membrane-bound trehalase, while inhibitor-M inhibited membrane-bound trehalase slightly more than soluble trehalase. The inhibitory activity of inhibitor-M was high during the early to middle feeding period, followed by a sudden decrease during the late feeding period. Inhibitor-P activity increased throughout the feeding period, and markedly decreased 2 days after gut purge. Thus, the concentration of two inhibitors in hemolymph exhibited stage-specific changes, indicating the presence of a coordinated inhibition of two types of trehalase. Therefore, trehalose concentration regulation in hemolymph appears to be complex, consisting of two inhibitors, two types of trehalase, and probably their gene expression.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์

การควบคุมการแสดงออกของยีนทรีฮาเลส กิจกรรมของทรี

ฮาเลสและตัวยับยั้งทรีฮาเลสโดยฮอร์โมนในหนอนเยื่อไผ่

(Omphisa fuscidentalis) และตัวยับยั้งทรีฮาเลสในหนอน

ไหม (Bombyx mori)

ผู้เขียน

นางสาวนุจิรา ทาดัน

ปริญญา

วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (ชีววิทยา)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

รศ. ดร. ทิพวรรณ สิงห์ไตรภพ

ประธานกรรมการ

Prof. Dr. Sho Sakurai

กรรมการ

รศ. สมศักดิ์ วนิชาชีวะ

กรรมการ

บทคัดย่อ

ทางเดินอาหารส่วนกลางของหนอนเยื่อไผ่ (*Omphisa fuscidentalis*) ระบุยีนที่เข้ารหัสโปรตีนที่มี

เอนไซม์ soluble และ membrane-bound ทรีฮาเลส โดยกิจกรรมของ soluble trehalase มีประมาณสาม

ในสี่ของของกิจกรรมของทรีฮาเลสในทางเดินอาหารส่วนกลาง การกระตุ้นโดยฮอร์โมน juvenile

hormone analogue (JHA) มีผลชักนำการเข้าดักแด้และในขณะเดียวกันก็มีผลทำให้กิจกรรมของ soluble

trehalase เพิ่มขึ้นในระยะก่อนเข้าดักแด้ การฉีดฮอร์โมน 20-hydroxyecdysone (20E) มีผลกระตุ้น

การทำงานของ soluble trehalase ในวันที่ 5 หลังจากได้รับฮอร์โมน โดยขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของ

ฮอร์โมนที่ได้รับ แต่ในทางตรงกันข้ามกิจกรรมของ membrane-bound trehalase ไม่เกิดการ

เปลี่ยนแปลงเมื่อทำการตรวจสอบภายใต้สภาวะเดียวกัน ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการโคลนนิ่งและหา

ลำดับเบสของ *O. fuscidentalis trehalase-1 (OfTreh-1)* และ *trehalase-2 (OfTreh-2)* ของหนอนเยื่อไผ่

ซึ่งเปลี่ยนรหัสเป็นโปรตีน soluble และ membrane-bound trehalase ตามลำดับ ซึ่งยีน *Treh-1* ประกอบด้วย 581 กรดอะมิโน ในขณะที่ *Treh-2* ประกอบด้วย 648 กรดอะมิโน โดยมี putative transmembrane domain ในส่วนท้ายของลำดับกรดอะมิโน ในทางเดินอาหารส่วนกลางของหนอนเชื้อไฝระยะไดอะพอสการแสดงออกของยีน *Treh-1* สูงกว่า *Treh-2* ประมาณ 27 เท่า เมื่อได้รับ JHA และการแสดงออกของยีน *Treh-1* จะเพิ่มสูงขึ้นเรื่อยๆกระทั่งถึงระยะก่อนเข้าดักด้ แต่การแสดงออกของยีน *Treh-2* จะคงอยู่ในระดับต่ำเท่ากับระยะเริ่มต้นเท่านั้น และในทำนองเดียวกันการฉีด 20E ให้แก่หนอนเชื้อไฝมีผลกระตุ้นการแสดงออกของยีน *Treh-1* แต่ไม่มีผลต่อการแสดงออกของยีน *Treh-2* จากผลการทดลองที่ได้พบว่าการเพิ่มขึ้นของกิจกรรมของ soluble trehalase ในระยะที่มีการเปลี่ยนแปลงเป็นดักด้นั้นเป็นผลเนื่องมาจากการกระตุ้นการแสดงออกของยีน *Treh-1* และพบว่า membrane-bound trehalase ในหนอนเชื้อไฝนั้นไม่เกี่ยวข้องในการควบคุมการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของน้ำตาลทรีฮาโลสในระหว่างที่มีการเปลี่ยนแปลงจากตัวหนอนเป็นดักด้

ในทางเดินอาหารของหนอนไหม (*Bombyx mori*) มีเอนไซม์ทรีฮาเลสสองชนิดได้แก่ soluble และ membrane-bound trehalase ความเข้มข้นของน้ำตาลทรีฮาโลสของตัวหนอนถูกเก็บสะสมไว้ในระดับที่ค่อนข้างสูงคงที่ตลอดระยะที่มีการกินอาหารของระยะอินสตาร์ที่ห้า ทั้งที่ในระยะนี้ก็ตรวจพบกิจกรรมของทรีฮาเลสในทางเดินอาหารส่วนกลาง ในฮีโมลิมป์ของหนอนไหมมีทรีฮาเลสอินฮิบิเตอร์สองชนิดได้แก่ อินฮิบิเตอร์ที่เป็นโปรตีน (inhibitor-P) และชนิดที่สามารถสกัดได้ด้วยเมธานอลและเอทานอล (inhibitor-M) อินฮิบิเตอร์สองชนิดนี้ยับยั้งกิจกรรมของทั้ง soluble และ membrane-bound trehalase ได้ด้วยความระดับความไวที่แตกต่างกัน โดย inhibitor-P สามารถยับยั้งกิจกรรมของ soluble trehalase ได้ดีกว่า ในขณะที่ inhibitor-M ยับยั้งกิจกรรมของ membrane-bound trehalase ได้มากกว่า soluble trehalase เล็กน้อย ประสิทธิภาพในการทำงานของ inhibitor-M จะสูงในช่วงต้นจนถึงกลางของ

ระยะที่มีการกินอาหารแล้วจะลดลงทันทีในช่วงท้ายของระยะที่มีการกินอาหาร ส่วน inhibitor-P จะมีการทำงานสูงขึ้นเรื่อยๆ ตลอดระยะที่มีการกินอาหารและจะลดลงอย่างเห็นได้ชัดในวันที่ 2 หลังจากการเกิด gut purge จะเห็นได้ว่าอินฮิบิเตอร์ทั้งสองชนิดในฮีโมลิมพ์มีการทำงานที่จำเพาะต่อระยะการเจริญเติบโตซึ่งแสดงถึงการทำงานในการยับยั้งร่วมกัน ดังนั้นการควบคุมความเข้มข้นของทรีฮาโลสในฮีโมลิมพ์ในหนอนไหมจึงมีความซับซ้อน ซึ่งประกอบด้วยกิจกรรมของทรีฮาเลสอินฮิบิเตอร์สองชนิด กิจกรรมของเอนไซม์ทรีฮาเลสสองชนิด และอาจรวมถึงการแสดงออกของยีนดังกล่าว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved