

**Factors Involved in Sperm Fertilizing Capacity in *Penaeus monodon*:
Molecular Characterization, Controlling of Signal Transduction, and
Application for Improving Sperm Fertilizing Ability**

Abstract

Fertilizing ability of the sperm in marine shrimp depends largely on two major processes – interaction with egg surface and acrosome reaction, since the sperm in these animals are immotile. Sperm of *P. monodon* undergo unique features of acrosome reaction (AR) that are drastically different from a well-studied penaeoid shrimp, *Sicyonia ingentis*. AR is completed within 45-60 sec and comprises only acrosomal exocytosis and depolymerization of sperm anterior spike. A natural AR inducer has long been known to be substances released from eggs, so called egg water (EW), which is made up mainly of cortical rods (CRs) and thelycal fluid (TF). CRs were heavily glycosylated, having mannose as a major sugar composite. Biogenesis of the CR proteins began at stage II developing oocyte in the dilated ER complex and then exocytosed as small vesicles into extracellular crypts of the mature oocyte to form a bottle brush structure, a typical feature of glycosaminoglycan in the jelly substances. Physiologically, water-soluble CR (wsCR) had its superior AR inducing ability (comparable to the ability of EW) which was shown to be modulated by the exposed mannose moiety of wsCR.

Sperm of *P. monodon* also possessed trypsin-like enzymes both on the sperm surface and in the acrosomal region. This trypsin-like enzyme is involved in self-regulation of the induction of acrosome reaction which is uniquely distinct from other marine shrimp (where the trypsin activity is derived from EW). Activation of trypsin-like enzyme prior to sperm-egg interaction was also detected in Thai abalone, *Haliotis asinina* – only sperm that were spawned into seawater engaged high trypsin-like activity but not testicular sperm. Therefore, our results suggest that activation of trypsin-like activity in the sperm of marine invertebrates seems to be an important characteristic that can be used to predict sperm fertilizing capacity (protein biomarker) in marine economic animals at least in the case of our Thai shrimp and abalone.

โครงการ ปักจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพการปฏิสนธิของเซลล์อสุจิในกึ่งกุลาคำ: การจำแนกชนิด การควบคุมสัญญาณส่งผ่านในเซลล์ และ การนำไปใช้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการปฏิสนธิ

บทคัดย่อ

ความสามารถในการปฏิสนธิของเซลล์อสุจิในกึ่งทะเล ขึ้นอยู่กับองค์ประกอบเพียง 2 ส่วนหลัก คือ ขบวนการการเกาะเกี่ยวกับผิวไข่และการกระตุ้นการแตกของถุงเอ็นไซม์ของอสุจิ (acrosome reaction) ทั้งนี้เนื่องจากเซลล์อสุจิในกึ่งทะเลไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ ขบวนการกระตุ้นการแตกของถุงเอ็นไซม์ (AR) ในกึ่งกุลาคำ (*P. monodon*) มีความแตกต่างกันกับกึ่งทะเลอื่น ๆ เช่น *Sicyonia ingentis* ในเรื่องของเวลาและกลไกการเกิด โดยกึ่งกุลาคำจะใช้เวลาเพียง 45-60 วินาที และประกอบด้วยขบวนการการแตกของถุงเอ็นไซม์ และการหดสั้นของแท่งแหลมหน้าต่อเซลล์อสุจิ (anterior spike) สารเหนี่ยวนำธรรมชาติของขบวนการ AR ในกึ่งทะเลเกิดมาจากการคัดหลั่งและผสมกันของสารจาก 2 แหล่งคือ จาก cortical rod (CR) และ thelylal fluid (TF) จากการศึกษาของเราพบว่า CR มีองค์ประกอบของคาร์โบไฮเดรตเป็นจำนวนมาก ซึ่งน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบหลักคือแมนโนส ขบวนการสร้าง (Biogenesis) ของสาร CR เริ่มต้นจากใน ER ที่มีลักษณะขยายโต (dilated) ในเซลล์ไข่ระยะที่ 2 จากนั้นจะถูกส่งออกไปภายในช่องนอกเซลล์ โดยขบวนการขนถ่ายแบบ exocytosis ผ่านถุงเก็บขนาดเล็กไปสะสมเป็นเนื้อสารที่มีลักษณะคล้ายกับแป้งล้างขวด ซึ่งเป็นรูปลักษณะของสารจำพวก glycosaminoglycan ในเซลล์ไข่ คุณสมบัติของสารที่สกัดมาจากส่วนที่ละลายน้ำของ CR อีกประการหนึ่งคือ สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดขบวนการ AR ได้ดีมาก (ทัดเทียมกับตัวเหนี่ยวนำธรรมชาติ) ซึ่งเราได้พิสูจน์ว่าคุณสมบัตินี้เกิดจากกลุ่มน้ำตาลแมนโนสที่มีอยู่เป็นจำนวนมากใน CR นั้นเอง

เซลล์อสุจิของกึ่งกุลาคำยังประกอบด้วยเอ็นไซม์ทริปซิน (trypsin) ทั้งบนผิวของเซลล์และในถุงเก็บเอ็นไซม์หน้าไข่ของเอ็นไซม์นี้ในเซลล์อสุจิคือการมีส่วนร่วมในการกระตุ้นขบวนการ AR ซึ่งเป็นแบบการควบคุมภายในตัวเอง (self-regulation) ที่มีลักษณะแตกต่างไปจากกึ่งทะเลชนิดอื่นซึ่งรายงานว่างเอ็นไซม์ทริปซินอยู่ในสารคัดหลั่งจากไข่ (egg water, EW) เรายังพบอีกว่ากระตุ้นเอ็นไซม์ทริปซินก่อนการเกิดปฏิสนธิระหว่างเซลล์อสุจิและเซลล์ไข่ก็สามารถพบได้ในเซลล์อสุจิของหอยเป่าสือไทย (*Haliotis asinina*) โดยเซลล์อสุจิที่ถูกปล่อยลงในน้ำทะเลจะมีการกระตุ้นของเอ็นไซม์ในระดับที่สูงกว่าเซลล์ที่ยังคงอยู่ในอัมชะ ดังนั้นเราอาจจะสรุปได้ว่าการกระตุ้นเอ็นไซม์ทริปซิน น่าจะเป็นขบวนการที่สำคัญมาก ที่บ่งบอกถึงประสิทธิภาพของการปฏิสนธิของเซลล์อสุจิ (อาจจะเรียกว่า biomarker ในระดับโปรตีน) อย่างน้อยในสัตว์ทะเล 2 ชนิดที่เราทำการศึกษาคือ กึ่งกุลาคำ และหอยเป่าสือ