

การระบุยีน ABC Transporters จากจีโนมของหอยมุกแกลบ (*Pinctada fucata*) ด้วยวิธีการทางชีวสารสนเทศศาสตร์

Genome-Wide Identification of ABC Transporter Gene Family in the Pearl Oyster (*Pinctada fucata*) Using Bioinformatic Approaches

ณัฐวัชร โตสัจจะ¹, ปฐมฤกษ์ อิงสันเทียะ² และ สุนทิน กิ่งทอง^{1*}

Nattawat Tosatja¹, Patamarerk Engsontia² and Sutin Kingtong^{1*}

¹ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

²ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

¹Biology Department, Faculty of Science, Burapha University

²Department of Biology, Faculty of Science, Prince of Songkla University

Received : 22 June 2018

Accepted : 7 September 2018

Published online : 17 September 2018

บทคัดย่อ

หอยมุกแกลบ (*Pinctada fucata*) เป็นสัตว์เศรษฐกิจที่มีการเพาะเลี้ยงทางภาคใต้ของประเทศไทย และมักประสบปัญหาด้านสภาพแวดล้อมทำให้ตายหรือชะงักการเจริญเติบโต ในสัตว์น้ำพบกลไกการปรับตัวในสภาพแวดล้อมที่ปนเปื้อนสารเคมี โดยมีกลไกกำจัดสารปนเปื้อนออกจากเซลล์ซึ่งอาศัยการทำงานของโปรตีนในวงศ์ ABC transporter สำหรับหอยสองฝาพบรายงานว่ามีโปรตีน ABC transporter เกี่ยวข้องกับการขับสารปนเปื้อนออกจากเซลล์ ทำให้สามารถปรับตัวและทนต่อมลพิษได้ดี อย่างไรก็ตามยังไม่เคยมีการระบุชนิดและจำนวนของยีนในวงศ์ยีน ABC transporter ในจีโนมของหอยมุกแกลบ ด้วยเหตุนี้คณะผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาจำนวนและจำแนกวงศ์ย่อยของโปรตีน ABC transporter ในจีโนมของหอยมุกแกลบ รวมทั้งวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของโปรตีนวงศ์นี้เทียบกับสิ่งมีชีวิตอื่น ได้แก่ แมลงหวี่ *Drosophila melanogaster* โรติเฟอรัส *Brachionus koreanus* หนอนตัวกลม *Caenorhabditis elegans* ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* และมนุษย์ *Homo sapiens* โดยใช้การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคทางชีวสารสนเทศศาสตร์ พบว่าสามารถระบุยีนในวงศ์ ABC transporter ในหอยมุกแกลบได้ทั้งหมด 65 ยีน แบ่งได้เป็น 8 วงศ์ย่อย ได้แก่ ABCA ถึง ABCH ซึ่งประกอบด้วยสมาชิกจำนวน 10, 15, 20, 3, 1, 3, 12 และ 1 ยีน ตามลำดับ โดยพบว่าการเพิ่มจำนวนยีนของยีนในวงศ์ย่อย ABCB, ABCC และ ABCG ซึ่งเป็นยีนที่เคยมีรายงานว่าเกี่ยวข้องกับการกำจัดสารพิษในสัตว์น้ำ จากข้อมูลการศึกษาในครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่าหอยมุกแกลบมีแนวโน้มในการปรับตัวเพื่อให้สามารถดำรงชีวิตในสภาพแวดล้อมที่มีการปนเปื้อนได้ดี ผลจากการศึกษาครั้งนี้จะเป็นประโยชน์ในการศึกษาการป้องกันตัวจากสารพิษของหอยมุก ทำให้เข้าใจชีววิทยาและการปรับตัวในระบบนิเวศมากขึ้น ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการเพาะเลี้ยงหอยมุกในสภาพแวดล้อมที่มีการเปลี่ยนแปลงต่อไปในอนาคต และยังเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาในกลุ่มนี้ในหอยชนิดอื่นต่อไป

คำสำคัญ: หอยมุก, ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ, ABC ทรานสปอร์ตเตอร์, ยีน, โปรตีน

*Corresponding author. E-mail : sutin@buu.ac.th

Abstract

Pearl oyster (*Pinctada fucata*) is an economically important species cultivated in the South of Thailand. The cultures can be affected by environmental pollution leading to the reduction of growth and survival. Multixenobiotic resistance mechanism has been reported in aquatic organisms mediated by ABC transporters. In bivalves, these proteins have been reported to pump chemical pollutants out of the cells. As a result, those animals can adapt and survive in a polluted environment. However, ABC transporters have not been identified in the Pearl oyster's genome. We, therefore, investigated the gene family of ABC transporters in this species in order to identify gene numbers and classify them into subfamilies. Also, the evolutionary relationships of this gene family were determined in comparison with other organisms including *Drosophila melanogaster*, *Brachionus koreanus*, *Caenorhabditis elegans*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Homo sapiens*. In the present study, 65 ABC transporters were identified in the Pearl oyster genome which include 10, 15, 20, 3, 1, 3, 12 and 1 ABC transporters belonging to subfamilies ABCA-ABCH, respectively. Gene expansions were found in subfamilies ABCB, ABCC and ABCG. Members of these subfamilies have been reported to functions as multixenobiotic transporter in aquatic organisms. Therefore multixenobiotic resistance should be exhibited in the Pearl oyster and assist them to adapt and survive in contaminated environments. The results of this work are essential for further investigation of multixenobiotic resistance mechanisms in this species. This would eventually benefit aquaculture practices and would also lead to the study of this gene family functions in other mollusks.

Keywords: pearl oyster, phylogenetic tree, ABC transporter, gene, protein

บทนำ

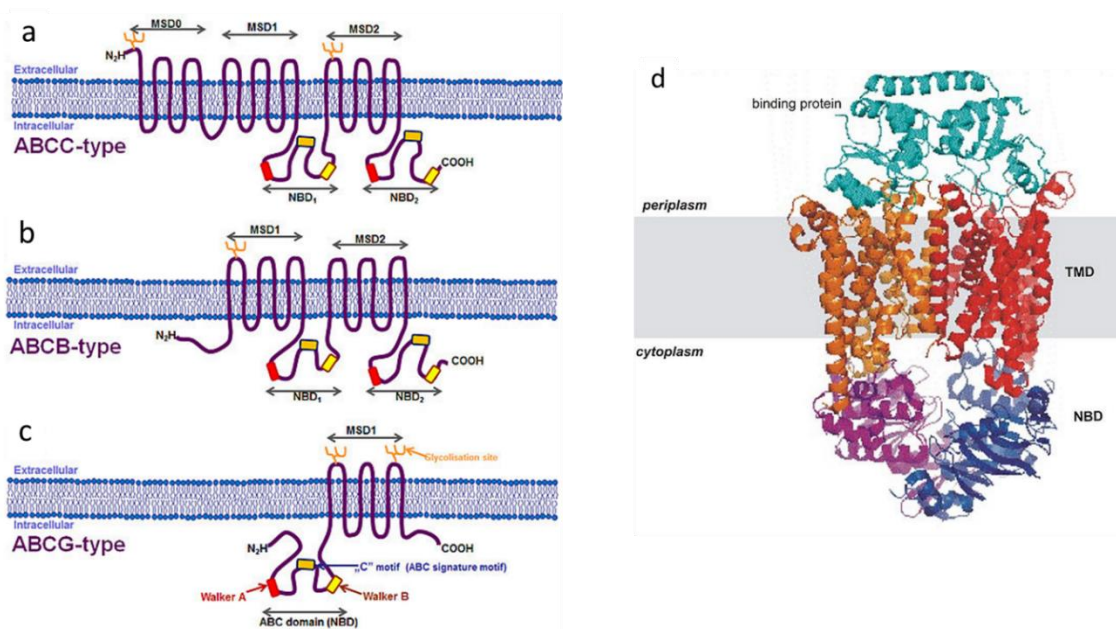
หอยมุกแกลบ (*Pinctada fucata*) เป็นสัตว์เศรษฐกิจที่มีมูลค่าสูง ในธรรมชาติพบได้ตามชายฝั่งทะเลอันดามัน และมีการเพาะเลี้ยงเชิงพาณิชย์มากบริเวณชายฝั่งของจังหวัดภูเก็ต ปัญหาหนึ่งที่มีักพบในการเพาะเลี้ยงหอยมุก คือ ปัญหาในด้านสภาพแวดล้อม เช่น น้ำเสียหรือคุณภาพของน้ำทะเลที่เปลี่ยนไป ทำให้หอยมุกตายหรือชะงักการเจริญเติบโต (Kanjanchatree *et al.*, 2004) ประกอบกับการดำรงชีวิตแบบอยู่กับที่และกินอาหารด้วยการกรองกิน ทำให้มีโอกาสสัมผัสกับสารเคมีที่ปนเปื้อนมากับน้ำโดยตรง ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่ออุตสาหกรรมการผลิตมุกของประเทศ

การศึกษาในสัตว์น้ำหลายชนิดพบว่าสัตว์น้ำมีกลไกการปรับตัวให้มีชีวิตรอดในสภาพแวดล้อมที่มีการปนเปื้อนสารเคมี (multixenobiotic resistance; MXR) โดยกลไกดังกล่าวเกี่ยวข้องกับการกำจัดสารพิษออกจากเซลล์โดยอาศัยการทำงานของโปรตีนในกลุ่ม ABC transporter (Smital *et al.*, 2003; Kurelec *et al.*, 1996; Minier and Moore, 1996; McFadzen *et al.*, 2000; Miller *et al.*, 2002; Cai *et al.*, 2003; Sauerborn *et al.*, 2004; Zaja *et al.*, 2007; Luedeking and Koehler, 2004) สำหรับหอยสองฝา พบรายงานในหอยนางรม *Saccostrea forskali* และ หอยแมลงภู่ *Mytilus edulis* ว่าโปรตีน ABC transporter เกี่ยวข้องกับการขับสารพิษหรือสารเคมีปนเปื้อนออกจากเซลล์ ทำให้หอยสามารถปรับตัวและทนต่อมลพิษได้ดีและยังสามารถสืบพันธุ์ต่อไปได้ (Kingtong *et al.*, 2007; Rioult *et al.*, 2014) อย่างไรก็ตาม ยังไม่เคยมีรายงานการศึกษาของยีน ABC transporter ในหอยมุกแกลบ

โปรตีนในวงศ์ยีน ABC transporter เป็นโปรตีนที่พบในเยื่อหุ้มเซลล์ (transmembrane protein) จัดเป็นวงศ์ยีนที่มีจำนวนยีนมากที่สุดวงศ์ยีนหนึ่งในจีโนมสิ่งมีชีวิต (Higgins, 1998) สามารถพบได้ในสิ่งมีชีวิตตั้งแต่โปรคาริโอตจนถึงยูคาริโอต (Dean *et al.*, 2001) โปรตีนกลุ่มนี้ทำหน้าที่ขนส่งสารหลายชนิดผ่านเยื่อหุ้มเซลล์และเยื่อหุ้มออร์แกเนลล์โดยใช้พลังงาน ATP (Alaimo *et al.*, 2006) โครงสร้างหลักของโปรตีนกลุ่มนี้ประกอบด้วยองค์ประกอบสำคัญสองส่วน ได้แก่ transmembrane domain (TMD) คือส่วนที่แทรกผ่านเยื่อหุ้ม และ nucleotide-binding domain (NBD) คือส่วนจับกับโมเลกุล ATP (Higgins & Linton, 2004; Higgins, 2007; Rees *et al.*, 2009)

วงศ์ยีน ABC transporter แบ่งเป็น 8 วงศ์ย่อย (subfamily A - H) ซึ่งมีความแตกต่างกันของลักษณะโดเมนโปรตีน อาจมีลักษณะเป็น full transporter คือ โครงสร้างประกอบด้วย 2 TMD และ 2 NBD (subfamily A, B-full, C) หรือ half transporter คือ โครงสร้างประกอบด้วย 1 TMD และ 1 NBD (B-half, D, G, H) ดังภาพที่ 1 (Dawson & Locher, 2006) หน้าที่ของ TMD คือจับกับโมเลกุลของสาร (substrate) เพื่อขนส่งสารผ่านเยื่อหุ้ม ในขณะที่บริเวณ NBD มีตำแหน่ง ATP-binding site เป็นองค์ประกอบ ซึ่งจะจับกับโมเลกุล ATP เพื่อไฮโดรไลซ์และขับเคลื่อนโปรตีนในกระบวนการขนส่งสารผ่านเยื่อหุ้ม (Higgins 1992; Higgins & Linton 2004; Rees *et al.*, 2009)

ลำดับกรดอะมิโนในตำแหน่ง NBD เป็นลำดับสงวน (conserved) กล่าวคือมีการเปลี่ยนแปลงน้อยในช่วงวิวัฒนาการ เนื่องจากทำหน้าที่จับกับโมเลกุล ATP เพียงอย่างเดียว ในขณะที่ลำดับกรดอะมิโนในตำแหน่ง TMD จะมีความแปรผันมาก ทำให้จับกับโมเลกุลของสารได้แตกต่างกัน ดังนั้นโปรตีน ABC transporter ต่างชนิดกันจึงอาจมีความจำเพาะกับโมเลกุลของสารแตกต่างกันเพื่อทำหน้าที่ลำเลียงสารต่าง ๆ เช่น กรดอะมิโน เพปไทด์ น้ำตาล ไขมัน สารเมแทบอลิต์ และ ยาบางชนิด ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์หรือเยื่อหุ้มออร์แกเนลล์ (Dean *et al.*, 2001; Vasiliou *et al.*, 2009)



ภาพที่ 1 โครงสร้างของโปรตีนในกลุ่ม ABC transporter แบบ full transporter (a และ b) และ half transporter (c) (https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Membrane_topology_models_of_the_human_ABC_transporter_protein_B,_C,_and_G_subfamilies.jpg) และตัวอย่างโครงสร้างของโปรตีน ABC transporter ที่พบในเยื่อหุ้มเซลล์ (d) (<https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Btucd.jpg>)

คำอธิบาย TMD = transmembrane domain, NBD = nucleotide binding domain

สิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดมีจำนวนยีนที่สร้างโปรตีน ABC transporter แตกต่างกันไป เช่น จีโนมของมนุษย์พบสมาชิก 48 ยีน (Dean *et al.*, 2001) จีโนมของปลา *Danio rerio* พบสมาชิก 55 ยีน (Annilo *et al.*, 2006) จีโนมของมอดแป้ง *Tribolium castaneum* พบสมาชิก 73 ยีน (Broehan *et al.*, 2013) จีโนมของไรติเฟอร์ *Brachionus koreanus* พบสมาชิก 61 ยีน (Jeong *et al.*, 2017) จีโนมของหนอนตัวกลม *Caenorhabditis elegans* พบสมาชิก 60 ยีน (Sheps *et al.*, 2004) จีโนมของไรน้ำ *Daphnia pulex* พบสมาชิก 65 ยีน (Sturm *et al.*, 2009) และจีโนมของโคฟีพอด *Tigriopus japonicus* พบสมาชิก 46 ยีน (Jeong *et al.*, 2014) โดยมีความแปรผันของจำนวนยีนในแต่ละวงศ์ย่อย (A-H) อย่างไรก็ตามยังไม่มี การรายงานการศึกษาของยีนนี้ในสัตว์กลุ่มหอย (Phylum Mollusca)

เนื่องจากหอยมุกแกลบเป็นสัตว์เศรษฐกิจที่มีการเพาะเลี้ยงใกล้กับบริเวณชายฝั่งของประเทศไทยดังที่กล่าวไปแล้วและเป็นสัตว์ที่เกาะอยู่กับที่แบบถาวรโดยกินอาหารแบบกรองกิน ดังนั้นหากมีการปนเปื้อนจากสารเคมีเกิดขึ้น บริเวณชายฝั่งทะเลย่อมมีโอกาสได้รับสัมผัสกับสารเคมีปนเปื้อนมากับน้ำโดยตรง ผู้วิจัยจึงมีความสนใจศึกษาของยีน ABC transporter ของหอยมุกแกลบ เพราะอาจมีบทบาทสำคัญต่อการกำจัดสารพิษ ตามที่มีรายงานการศึกษาในหอยชนิดอื่น (Kingtong *et al.*, 2007; Rioult *et al.*, 2014)

เนื่องจากปัจจุบันมีข้อมูลจีโนมของหอยมุกแกลบ (Takeuchi *et al.*, 2012, 2016) จึงเป็นเครื่องมือสำคัญที่ใช้ระบุ ยีน ABC transporter ของหอยชนิดนี้ได้ การศึกษาจีโนมมักใช้โปรแกรมอัตโนมัติในการระบุยีน (automated annotation) เพื่อให้สามารถระบุยีนจำนวนมากจากทั้งจีโนมได้ แต่วิธีดังกล่าวมีข้อจำกัดในกรณีที่ยีนมีความแตกต่างจากสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นมาก (highly divergent) หรือ ยีนมีความยาวและมีจำนวนอินทอนมาก ทำให้โมเดลยีนมีความผิดพลาดสูง การศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อระบุยีน ABC transporter จากจีโนมของหอยมุก *Pinctada fucata* Ver 2.0 (Takeuchi *et al.*, 2016) โดยใช้มนุษย์ดำเนินการ (manual annotation) เพื่อให้ได้โมเดลยีนที่ถูกต้องและครบถ้วน และเพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของยีน ABC transporter จากหอยมุกแกลบและสัตว์กลุ่มอื่น ผลจากการศึกษาครั้งนี้จะเป็นประโยชน์ในการศึกษาการป้องกันตัวจากสารพิษของหอยมุก ทำให้เข้าใจชีววิทยาและการปรับตัวในระบบนิเวศของหอยชนิดนี้มากขึ้น และเป็นประโยชน์ต่อการศึกษายีนนี้ในหอยชนิดอื่นต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การระบุยีน ABC transporter จากจีโนมของหอยมุกแกลบ (*Pinctada fucata*)

คณะผู้วิจัยใช้วิธีระบุยีนโดยใช้คนดำเนินการ (manual annotation) แทนการใช้โปรแกรมอัตโนมัติ โดยระบุยีน ABC transporter จากฐานข้อมูลจีโนมหอยมุกแกลบ *Pinctada fucata* เวอร์ชัน 2.0 (Takeuchi *et al.*, 2016) (เข้าถึงได้จาก http://marinegenomics.oist.jp/pearl/viewer/info?project_id=36) มีขั้นตอนการดำเนินงาน รวบรวมข้อมูลโปรตีน ABC transporter จากสิ่งมีชีวิตที่มีความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการใกล้ชิดกับหอยมุกที่มีรายงานแล้ว ได้แก่ แมลงหวี่ (*D. melanogaster*) (Dean *et al.*, 2001) มนุษย์ (*H. sapiens*) (Vasiliou *et al.*, 2009) และ หนอนตัวกลม (*C. elegans*) (Sheps *et al.*, 2004) เพื่อใช้เป็นต้นแบบ (query) ในการค้นหา (BLAST) ด้วยวิธี tBLASTn (e-value = 1) (Altschul *et al.*, 1997) ผลของการ BLAST ทำให้ทราบว่าบริเวณใดของจีโนมหอยมุกมียีนที่สร้างโปรตีน ABC transporter ดึงข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ครอบคลุมส่วนที่คาดว่าจะมียีนเก็บไว้ จากนั้นใช้โปรแกรม GeneWise (Birney *et al.*, 2004) ทำนายการสร้างโปรตีนจาก DNA ส่วนดังกล่าว โดยใช้โปรตีน ABC transporter ของแมลงหวี่เป็นต้นแบบในการทำนาย หากโปรแกรม GeneWise ไม่สามารถตรวจพบส่วนของโปรตีนที่มีความ divergent สูง จะใช้โปรแกรม BDGP splice site prediction (Reese *et al.*, 1997) ทำนายส่วนเอกซอน (exon) และตำแหน่งการตัดอินทอน (intron) ตรวจสอบความถูกต้องของส่วนเอกซอนที่ระบุได้โดยแปลรหัสเป็นโปรตีนแล้วจัดเรียงเปรียบเทียบ (alignment) กับโปรตีนของสัตว์ชนิดอื่น

(แมลงหวี่ คน และหนอนตัวกลม) โปรตีนที่ถูกตัดของหอยมุกจะต้องแสดงลำดับกรดอะมิโนบางส่วนที่เป็นลำดับสงวน (conserved) นำผลที่ได้สร้างเป็นโมเดลยีน โดยระบุข้อมูลตำแหน่งของยีนในจีโนม ส่วนเอกซอนและอินทรอน ลำดับเบส และลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน ตรวจสอบความถูกต้องอีกครั้ง โดยนำโปรตีนที่ระบุได้ไป BLAST (tBLASTn) กับข้อมูลทรานสคริปโตมในฐานข้อมูลจีโนมของหอยมุก ลำดับกรดอะมิโนที่ระบุได้ต้องตรงกับโปรตีนจากยีนที่มีการแสดงออกจริง ตรวจสอบความถูกต้องของโครงสร้างโปรตีนที่ระบุได้ว่ามีลักษณะของ ABC transporter โดยใช้โปรแกรม InterProScan (Jones *et al.*, 2014) ทำนายตำแหน่งโดเมนของโปรตีน (Nucleotide binding domain: NBD และ Transmembrane domain: TMD) ซึ่งมีความแตกต่างกันในแต่ละวงศ์ยีนย่อย ตั้งชื่อยีนโดยใช้อักษรย่อแทนชื่อชนิด (Pfu) ตามด้วยวงศ์ยีนย่อย (ABCA-ABCH) และหมายเลขของยีนในวงศ์ยีนย่อย

2. การศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของยีน ABC transporter

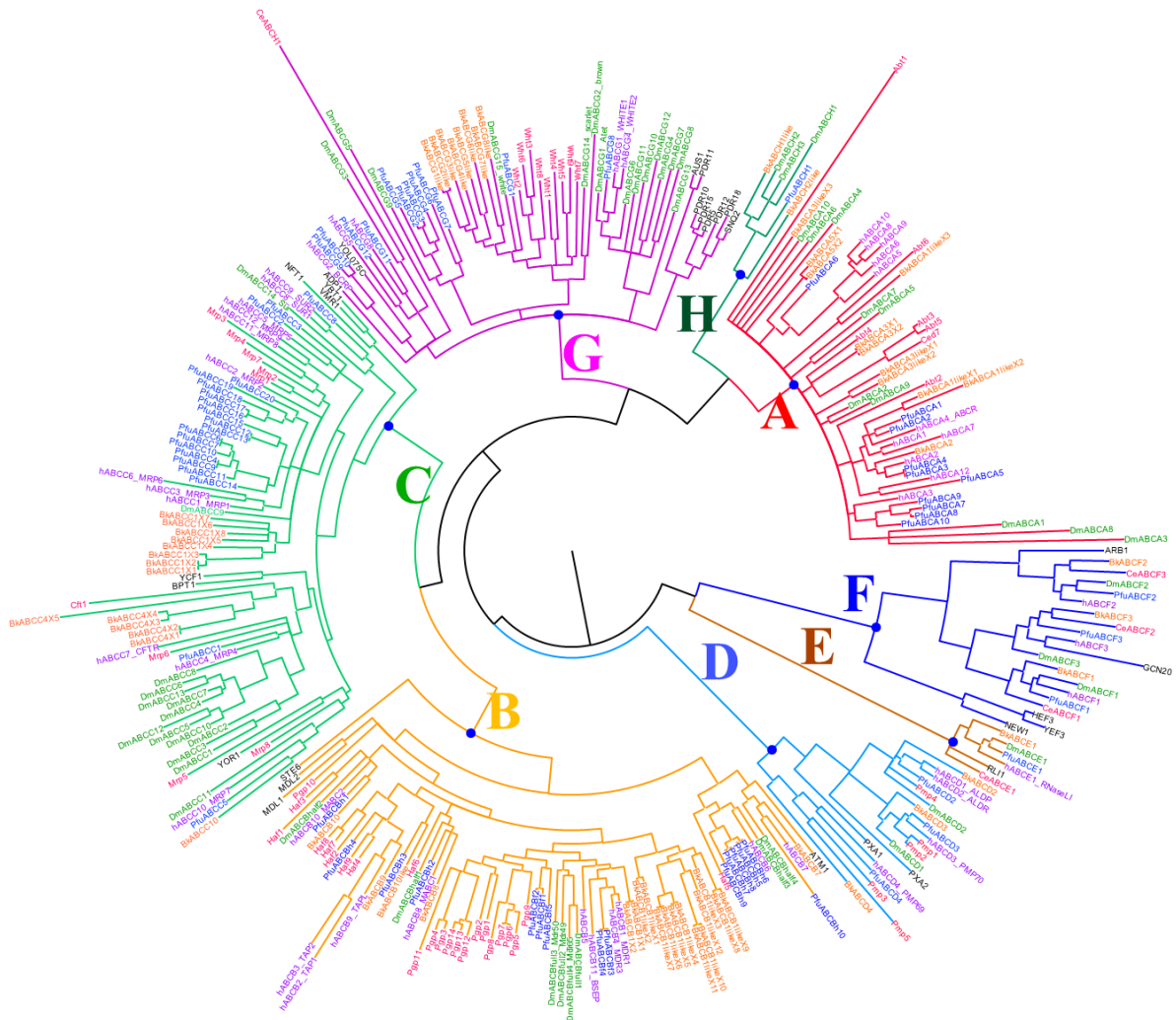
คณะผู้วิจัยใช้การศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Phylogenetic analysis) เพื่อยืนยันความถูกต้องของการระบุวงศ์ยีนย่อย ตรวจสอบการมีบรรพบุรุษร่วมของยีนจากหอยมุกแกลบและสิ่งมีชีวิตอื่น (orthologous relationships) ซึ่งเป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับทำนายหน้าที่ของยีนในหอยมุกแกลบ และ ศึกษาการเพิ่มจำนวนของยีนในช่วงวิวัฒนาการของหอยมุกแกลบ (lineage-specific gene expansion) ซึ่งสะท้อนการปรับตัวของหอยมุก การวิเคราะห์ที่ใช้โปรตีน ABC transporter ของหอยมุก ร่วมกับ โปรตีนจากแมลงหวี่ (*D. melanogaster*) (Dean *et al.*, 2001) มนุษย์ (*H. sapiens*) (Vasiliou *et al.*, 2009) หนอนตัวกลม (*C. elegans*) (Sheps *et al.*, 2004) โรติเฟอร์ (*B. koreanus*) (Jeong *et al.*, 2017) และ ยีสต์ (*S. cerevisiae*) (Decottignies & Goffeau, 1997) เนื่องจากโปรตีนของแต่ละวงศ์ยีนย่อยมีความแตกต่างกันมาก (จำนวนและการเรียงตัวของโดเมน) การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของทั้งวงศ์ยีน (subfamily A-H) (ภาพที่ 1) จึงใช้เฉพาะลำดับกรดอะมิโนส่วน NBD ที่อยู่ด้านปลาย N (N-terminus) ซึ่งมีส่วนที่เป็นลำดับสงวน (conserved) ในการสร้างแผนภูมิ (Sturm *et al.*, 2009; Jeong, Kim *et al.*, 2014) สำหรับการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแต่ละวงศ์ย่อยจะใช้ลำดับกรดอะมิโนทั้งหมดของโปรตีน จัดเรียงลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน (alignment) โดยใช้โปรแกรม MAFFT เวอร์ชัน 7 (Katoh and Standley, 2013) ตัดส่วนช่องว่าง (gaps) ใน alignment ด้วยโปรแกรม trimAl (Capella-Gutierrez *et al.*, 2009) นำผลที่ได้ไปสร้างแผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Phylogeny) ด้วยวิธี Bayesian analysis ด้วยโปรแกรม MrBayes เวอร์ชัน 3.2.6 ค่าความเชื่อมั่นของกิ่ง (branch support) คือ Bayesian posterior probabilities (PPS) (Ronquist *et al.*, 2012) และ แสดงแผนภูมิด้วย โปรแกรม FigTree (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>)

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้เป็นการรายงานวงศ์ยีน ABC transporter ครั้งแรกในหอยมุกแกลบ *Pinctada fucata* ผู้วิจัยสามารถระบุยีน ABC transporter ในจีโนมหอยมุกแกลบได้ทั้งหมด 65 ยีน เป็นโมเดลที่สมบูรณ์ประมาณ 26% (17/65) โมเดลที่ขาดปลายด้าน N 6% (4/65) ขาดปลายด้าน C 2% (1/65) ขาดบางส่วนภายในยีน 43% (28/65) และขาดมากกว่าหนึ่งแบบ 23% (15/65) ทั้งนี้เป็นเพราะข้อมูลจีโนมของหอยมุกแกลบมี gaps จำนวนมาก (~7%, 55Mb/815Mb) (Takeuchi *et al.*, 2016) และยีน ABC transporter ของหอยมุกแกลบมีความยาวมาก โดยความยาวของยีน (ที่พบทั้งส่วนต้นและส่วนปลาย) อยู่ในช่วง ~8,000-57,000 คู่เบส (Mean \pm SE = 23,812 \pm 2,420 คู่เบส) จึงยังมีโอกาสสูงที่จะพบส่วน gaps ในยีนทำให้ได้โมเดลที่ไม่สมบูรณ์ หากต้องการโมเดลยีนที่สมบูรณ์จำเป็นต้องทำการทดลองเพิ่มเติมโดยการทำ PCR ส่วนของโมเดลยีนที่ขาดหายไปและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequencing) อย่างไรก็ตามทุกโมเดลที่ระบุ

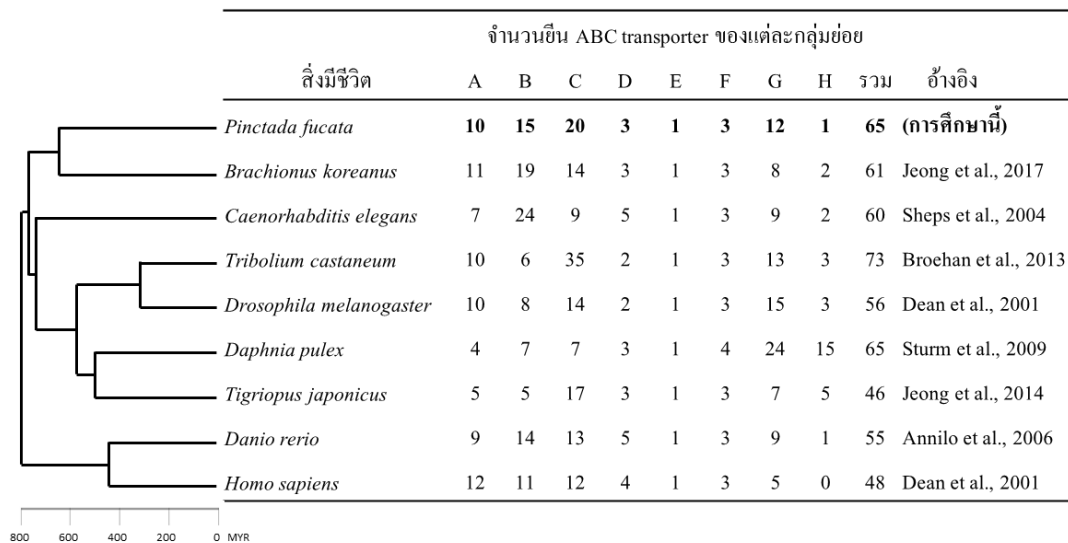
ในการศึกษาคั้งนี้มีการแสดงออกในหอยมุกแกลบ และโปรตีนที่ระบุได้มีความถูกต้องตรงกับข้อมูลทรานสคริปโตมของหอยมุกแกลบในฐานะข้อมูลจีโนม *Pinctada fucata* Version 2 (Takeuchi et al., 2016)

วงศ์ยีน ABC transporter ของหอยมุกแกลบ แบ่งออกได้เป็น 8 วงศ์ย่อย คือ ABCA ถึง ABCH (ภาพที่ 2) ซึ่งมีจำนวนสมาชิกในแต่ละวงศ์ย่อยเป็น 10, 15, 20, 3, 1, 3, 12 และ 1 ตามลำดับ (ภาพที่ 3) ผลการศึกษานี้ถูกยืนยันโดยการศึกษาค่าความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการร่วมกับยีนจากสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นที่พบว่ายีนในแต่ละวงศ์ย่อยมีความสัมพันธ์แบบ monophyletic (ทุกวงศ์ย่อยมีค่า branch support > 90%) นอกจากนี้การทำนายโดเมนของโปรตีน ABC transporter ของหอยมุกแกลบ ได้ผลสอดคล้องกับลักษณะโดเมนของโปรตีนแต่ละวงศ์ย่อย คือ full transporter (2 TMD และ 2 NBD) จำนวน 31 โปรตีน (48%) ประกอบด้วยวงศ์ย่อย ABCA, ABCB-full และ ABCC และ half transporter (1 TMD และ 1 NBD) จำนวน 25 ยีน (38%) ซึ่งประกอบด้วยวงศ์ย่อย ABCB-half, ABCD, ABCG และ ABCH ส่วนวงศ์ย่อย ABCE และ ABCF พบเพียงส่วน NBD 2 โดเมน ไม่พบส่วนบริเวณส่วนที่เป็น TMD (ภาพที่ 4) ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับโครงสร้าง ABC transporter ของสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น (Dean et al., 2001)

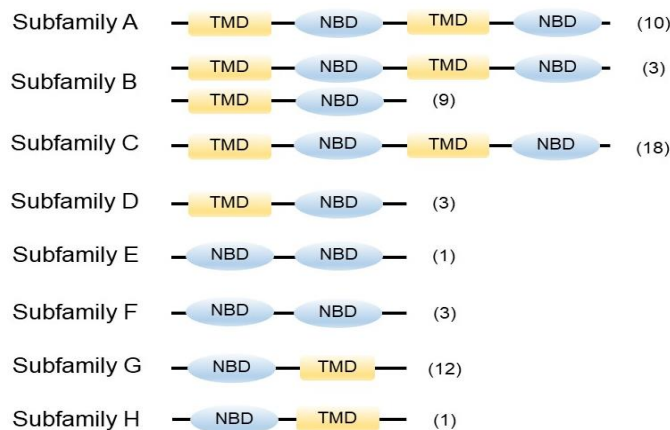


ภาพที่ 2 แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ของวงศ์ยีน ABC transporter ของหอยมุก (*P. fucata*) ยีสต์ (*S. cerevisiae*) หนอนตัวกลม (*C. elegans*) แมลงหวี่ (*D. melanogaster*) โรติเฟอริ (*B. koreanus*) และ มนุษย์ (*H. sapiens*) ด้วยวิธี Bayesian analysis ตัวอักษร A - H แสดงวงศ์ย่อย

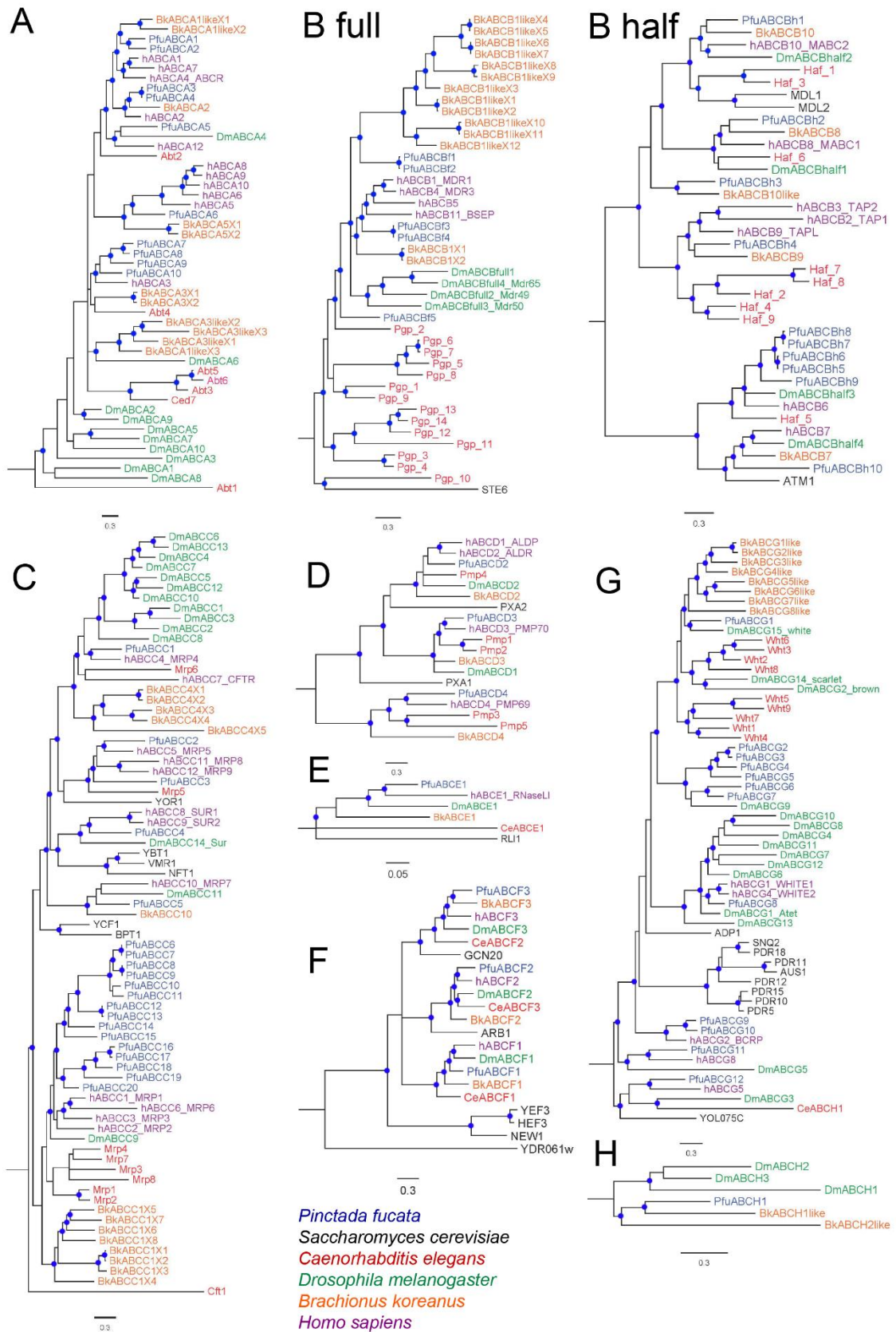
จำนวนยีน ABC transporter ของหอยมุกแกลบใกล้เคียงกับสัตว์ชนิดอื่น (46-73 ยีน) (ภาพที่ 3) และพบความแปรผันของจำนวนยีนในแต่ละวงศ์ย่อยในสัตว์แต่ละชนิด ในหอยมุกแกลบ วงศ์ย่อย ABCC มีจำนวนยีนมากที่สุด (~30%) คล้ายกับมอดแป้ง (*T. castaneum*) ที่มีจำนวนยีนวงศ์ย่อย ABCC มากที่สุดถึง 48% อย่างไรก็ตามสัตว์ชนิดอื่น เช่น หนอนตัวกลม (*C. elegans*) มีจำนวนยีนในวงศ์ย่อย ABCB มากที่สุด คือ 40% และ ไร่น้ำ (*D. pulex*) มีจำนวนยีนในวงศ์ย่อย ABCG มากที่สุด คือ 37% ความแปรผันของจำนวนยีนนี้สะท้อนถึงการปรับตัวทางวิวัฒนาการของสัตว์แต่ละชนิดที่สัมพันธ์กับหน้าที่ของโปรตีนในแต่ละวงศ์ย่อย อย่างไรก็ตามยีนในบางวงศ์ย่อยมีจำนวนเท่ากันในทุกชนิด เช่น วงศ์ย่อย ABCE จำนวน 1 ยีน และ วงศ์ย่อย ABCF จำนวน 3 ยีน สะท้อนการทำหน้าที่ที่คงเดิมของโปรตีนเหล่านี้ในช่วงวิวัฒนาการของสัตว์



ภาพที่ 3 จำนวนสมาชิกในแต่ละวงศ์ย่อยของ ABC transporter ซึ่งประกอบด้วยวงศ์ย่อย ABCA-H



ภาพที่ 4 ผลการทำนายโครงสร้างของโปรตีน ABC transporter ของหอยมุกแกลบ *Pinctada fucata* ในวงศ์ย่อย ABCA-H ซึ่งโปรตีนในกลุ่มนี้จะมีองค์ประกอบที่สำคัญได้แก่ transmembrane domain (TMD) และ nucleotide binding domain (NBD) หรืออาจพบ NBD เพียงอย่างเดียว *จำนวนรวมในแผนภาพไม่เท่ากับจำนวนรวม 65 ตัว เนื่องจากมีโปรตีนบางตัวไม่สมบูรณ์



ภาพที่ 5 แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแต่ละวงศ์ย่อย (ABCA-ABCH) ระหว่างยีนของหอยมุกแกลบและยีนจากสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น

ABCA

วงศ์ย่อย ABCA ประกอบด้วยสมาชิกจำนวน 10 ยีน ทั้งหมดเป็น full transporter ประกอบด้วย TMD 2 โดเมน และ NBD 2 โดเมน ยีนในกลุ่มนี้จะสร้างโปรตีนที่มีขนาดใหญ่มีความยาว 1,375 (PfuABCB4) ถึง 2,156 (PfuABCB1) กรดอะมิโน (ตารางที่ 1) ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมยีนในวงศ์ย่อย ABCA มีหน้าที่เกี่ยวกับการขนส่งไขมันและการสร้าง lipoprotein (Wenzel *et al.*, 2007) นอกจากนี้ยังพบว่า hABCA2 hABCA3 และ hABCA6 ในมนุษย์ มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการต้านยา (multidrug resistance) โดยการปั๊มยาออกจากเซลล์อีกด้วย (Vasiliou *et al.*, 2009)

ข้อมูลที่น่าสนใจประการหนึ่งคือ พบการเพิ่มจำนวนยีน (expansion) ของยีนในวงศ์ย่อย ABCA ในหอยมุกแกลบ อีก 4 ยีน (PfuABCA7 - PfuABCA10) ซึ่งเป็น orthologous กับยีน hABCA3 ที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับการต้านทานยาในมนุษย์ ข้อมูลดังกล่าวนี้เป็นการบ่งชี้ว่าหอยมุกอาจมีการวิวัฒนาการในการต้านทานความเป็นพิษจากสารเคมีที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม

ABCB

วงศ์ย่อย ABCB ประกอบด้วยสมาชิกจำนวน 15 ยีน โดยแบ่งเป็น full transporter 5 ยีน และ half transporter 10 ยีน การศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (ภาพที่ 5) ชี้ว่า โปรตีน half transporter มีความสัมพันธ์ของ orthologous ยีนระหว่างสิ่งมีชีวิตแบบ 1:1 ชัดเจนกว่าโปรตีน full transporter อย่างไรก็ตามพบการเพิ่มจำนวนยีนแบบจำเพาะกับชนิด (lineage-specific gene expansion) ของยีนในวงศ์ย่อย ABCB-half ในหอยมุกแกลบ 5 ยีน (PfuABCBh5 - PfuABCBh9) ซึ่งเป็น orthologous กับยีน hABCB6 ในมนุษย์ โปรตีนดังกล่าวพบได้ที่เยื่อหุ้มของไมโทคอนเดรียและทำหน้าที่เป็นช่องทางผ่านของธาตุเหล็ก (Vasiliou *et al.*, 2009)

ในมนุษย์ยีนในวงศ์ย่อย ABCB ที่มีการศึกษามาก คือ hABCB1 ซึ่งสร้างโปรตีน p-glycoprotein 1 (P-gp1) หรือ multidrug resistance 1 (MDR1) มีหน้าที่เกี่ยวกับการต้านยาต้านมะเร็งโดยการปั๊มยาหลายชนิดออกจากเซลล์ส่งผลให้การรักษาผู้ป่วยไม่ได้ผล (Gottesman *et al.*, 2002) ด้วยเหตุนี้โปรตีน MDR1 อาจมีหน้าที่สัมพันธ์กับการกำจัดสารเคมีหรือสารพิษในสิ่งแวดล้อมด้วย จากการศึกษาในหอยนางรม (Kingtong *et al.*, 2007) และ ในโรติเฟอร์ (Jeong *et al.*, 2017) พบว่าโปรตีน MDR1 มีหน้าที่สำคัญในการต้านสารพิษจากสิ่งแวดล้อมโดยการกำจัดสารพิษออกจากเซลล์ (multi-xenobiotic resistance; MXR) ซึ่งเป็นกลไกที่ทำให้สัตว์สามารถปรับตัวอยู่ในสภาพแวดล้อมที่มีการปนเปื้อนได้ดี นอกจากนี้ยังมีรายงานหน้าที่ของโปรตีน P-gp1 ในแมลงหลายชนิดที่เกี่ยวกับการต้านยาฆ่าแมลง เช่น สารกลุ่ม คาร์บาเมต ออร์แกโนฟอสเฟต ออร์แกโนคลอรีน และ ไพรีทรอยด์ (Dermauw & Van Leeuwen, 2014) การศึกษาครั้งนี้พบ orthologous ยีนของ ABCB1 ในหอยมุก โดยพบ PfuABCBf3 และ PfuABCBf4 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ ABCB1 ของมนุษย์ และ PfuABCBf1 และ PfuABCBf2 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ ABCB1-like จากโรติเฟอร์ (ภาพที่ 5B) ซึ่งทั้งสองกลุ่มนี้เกี่ยวข้องกับการกำจัดสารพิษออกจากเซลล์ จึงคาดว่าโปรตีนดังกล่าวอาจทำหน้าที่ในกลไกกำจัดสารพิษระดับเซลล์เพื่อกำจัดสารเคมีปนเปื้อนจากสิ่งแวดล้อมในหอยมุก อย่างไรก็ตามต้องทำการศึกษาเพื่อยืนยันต่อไปโดยสามารถเริ่มได้จากกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องซึ่งได้ระบุไว้ในผลการศึกษาค้นคว้าแล้ว

ABCC

โปรตีนที่สร้างจากยีนในวงศ์ย่อย ABCC เป็นที่รู้จักในชื่อ Multidrug resistance-associated protein หรือ MRP ซึ่งมีบทบาทเกี่ยวกับการขนส่งสารต่าง ๆ ออกจากเซลล์เช่นเดียวกับ P-gp แต่สิ่งที่แตกต่างกันระหว่าง P-gp และ MRP คือ MRP สามารถที่จะขนส่ง กลูตาไทโอน (glutathione) กลูโคโรเนต (glucuronet) และสารประกอบอินทรีย์ที่มีซัลเฟต เป็นองค์ประกอบ (sulfate-conjugated organic anions) และยังทำหน้าที่ขนส่งสารที่เป็นไอออน การสื่อสารระหว่างเซลล์ และรวมถึงการลำเลียงสารที่หลากหลาย (Deeley *et al.*, 2006; Leslie, 2012; Cole & Deeley, 2006)

ในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังพบว่าโปรตีน MRP มีบทบาทสำคัญเกี่ยวกับการกำจัดสารพิษ เช่น หอยสองฝา *Mytilus edulis* สร้างโปรตีน MRP เพิ่มขึ้น เมื่อเลี้ยงในสภาพแวดล้อมที่มีการปนเปื้อนของสารเคมี (Riout et al., 2014) ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาในหอยนางรม *Saccostrea forskali* ที่พบว่าโปรตีน MRP1 ถูกกระตุ้นให้สร้างมากขึ้นเมื่อหอยนางรมได้รับสารไตรบิวทิลทินซึ่งเป็นสารพิษกลุ่มออร์แกโนทินที่มีการปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม จึงคาดว่า MRP มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการขับสารพิษออกจากเซลล์ (Kingtong et al., 2007) การศึกษาในเม่นทะเล *S. purpuratus* พบว่ามีการสะสมของทองแดงสูงขึ้นเมื่อทำการยับยั้ง MRP (Wu et al., 2015) และยังพบอีกว่าในโรติเฟอร์ *B. Koreanus* มีการสะสมของสารเรืองแสงเมื่อทำการยับยั้งการทำงานของ MRP (Jeong et al., 2017)

ในหอยมุกเกลบสามารถระบุยีนในวงศ์ย่อย ABCC ได้ทั้งหมด 20 ยีนซึ่งถือว่ามากที่สุดเมื่อเทียบกับยีนในวงศ์ย่อยอื่นๆ ยีนที่มีระดับความสงวน (conserved) สูงที่สุดคือ PfuABCC4 ซึ่งเป็น orthologous กับยีน sulfonyleurea receptors (SUR) ของคนและแมลงหวี่ โปรตีน SUR เป็นหน่วยย่อยของ ATP-sensitive potassium channel ซึ่งมีหน้าที่สำคัญในกระบวนการทางสรีรวิทยา เช่น รักษาสมดุลกลูโคส ป้องกันการขาดเลือดเฉพาที่ (ischemia) และระบบภูมิคุ้มกัน (Dermauw & Van Leeuwen, 2014) ที่น่าสนใจคือในหอยมุกเกิดการเพิ่มจำนวนยีนแบบจำเพาะกับชนิดมากถึง 15 ยีน (PfuABCC6-20) โดยเป็น orthologous กับกลุ่มยีน hABCC1 ของมนุษย์ (ภาพที่ 5C) ซึ่งมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการดีออกา แสดงให้เห็นว่าในช่วงวิวัฒนาการของหอยมุกมีการเพิ่มจำนวนยีนเกิดขึ้น ผลการศึกษาสอดคล้องกับการศึกษาในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังชนิดอื่น เช่น แมลงหวี่ (*D. melanogaster*) และ โรติเฟอร์ (*B. koreanus*) ที่มีการเพิ่มจำนวนยีนแบบจำเพาะกับชนิดเช่นกัน คือ 11 ยีน และ 8 ยีน ตามลำดับ โปรตีนในวงศ์ย่อย ABCC ที่เกิดขึ้นใหม่ อาจทำหน้าที่ได้หลากหลายมากขึ้น เช่น ขับสารพิษได้หลายชนิด สัมพันธ์กับการปรับตัวของสิ่งมีชีวิตเพื่อความอยู่รอดในสภาพแวดล้อมที่มีสารพิษแตกต่างกัน

ABCD

ยีนในวงศ์ย่อย ABCD ในมนุษย์ทำหน้าที่เกี่ยวกับการขนส่งกรดไขมัน (VLCFA) และ acyl-coenzyme เข้าสู่เพอรอกซิโซม (Dean et al., 2001) คณะผู้วิจัยสามารถระบุยีนในวงศ์ย่อย ABCD จากจีโนมของหอยมุกได้ 3 ยีน และเมื่อนำไปสร้างแผนผังวิวัฒนาการของพบว่ายีนทั้ง 3 ยีนเป็น orthologous กับยีนในวงศ์ย่อย ABCD จากสิ่งมีชีวิตอื่นในลักษณะ 1:1 ซึ่งแสดงให้เห็นว่ามียีนนี้มีหน้าที่คงเดิมในอาณาจักรสัตว์ ดังนั้นหน้าที่ของยีนนี้ในแต่ละสิ่งมีชีวิตอื่นอาจเกี่ยวข้องกับการขนส่งกรดไขมันเช่นกัน

ABCE และ ABCF

ยีนในกลุ่ม ABCE และ ABCF มีโครงสร้างที่ประกอบไปด้วย NBD 2 โดเมน โดยไม่มี TMD ทำให้สันนิษฐานว่ายีนในกลุ่มนี้ไม่เกี่ยวข้องกับการลำเลียงสารผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งยีนในหอยมุกเองมีโครงสร้างเป็นแบบนี้เช่นกัน คณะผู้วิจัยสามารถระบุยีนในวงศ์ย่อย ABCE ได้ 1 ยีน และ ABCF ได้ 3 ยีน

ยีนในวงศ์ย่อย ABCE ในสัตว์แต่ละชนิดพบเพียงแค่ 1 ยีนเท่านั้น และมีระดับความสงวน (conserved) ของกรดอะมิโนสูงที่สุดในยูคาริโอต ABCE มีหน้าที่สำคัญในกระบวนการสังเคราะห์ไรโบโซมและการเริ่มต้นกระบวนการแปลรหัสสร้างโปรตีน (Andersen & Leever, 2007; Barthelme et al., 2011) นอกจากนี้พบว่าในมนุษย์ ABCE ยังทำหน้าที่ในการยับยั้ง ribonuclease L ที่สัมพันธ์กับการต้านการติดเชื้อไวรัสและการเกิดเนื้องอก (Bisbal et al., 1995) และการต่อต้านกระบวนการ apoptosis (Hassel et al., 1993; Le Roy et al., 2001) ในมอดแป้ง *T. castaneum* พบว่าเมื่อ knock-down ยีน ABCE ทำให้เกิดการตาย 100% เนื่องจากเกิดความผิดปกติในระยะดักแด้ (Broehan et al., 2013) สำหรับยีนในวงศ์ย่อย ABCF ของหอยมุกมีระดับความสงวน (conserved) สูงเช่นกัน หน้าที่ของยีนกลุ่มนี้มีรายงาน

ไม่มากนัก พบว่ามีความสำคัญในการเริ่มต้นกระบวนการแปลรหัสสร้างโปรตีน (Paytubi *et al.*, 2009) และในมนุษย์สันนิษฐานว่ามีหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบของเซลล์ (Vasiliou *et al.*, 2009)

ABCG

ยีนในวงศ์ย่อย ABCG ของหอยมุกประกอบด้วยสมาชิก 12 ยีน ซึ่งโครงสร้างของโปรตีนในวงศ์ย่อย ABCG นี้มีเอกลักษณ์คือมีโดเมนเป็นแบบย้อนกลับ (reverse) ทั้งหมด โดยมี TMD อยู่ทางด้านปลาย C และ NBD อยู่ทางด้านปลาย N ของโปรตีน และทั้งหมดมีโครงสร้างเป็น half transporter ที่มีโครงสร้างเป็น NBD – TMD ยีนในวงศ์ย่อยนี้มีการเพิ่มจำนวนยีนแบบจำเพาะกับชนิดในสัตว์ต่างๆ เช่นเดียวกับวงศ์ย่อย ABCB-full และ ABCC หน้าที่ของ ABCG ในมนุษย์เกี่ยวข้องกับการขนส่งไขมัน ยีนในวงศ์ย่อยนี้ที่เป็นที่รู้จักดีคือ ABCG2 สร้างโปรตีน Breast cancer resistance หรือ BCRP ซึ่งเกี่ยวข้องกับการต้านยาสำหรับมะเร็งทรวงอก (Gottesman *et al.*, 2002) มีหน้าที่ในการลำเลียงสารในกลุ่ม steroid (Vasiliou *et al.*, 2009) ในขณะที่ยีนในกลุ่มนี้บางยีนทำหน้าที่ควบคุมสีตาในแมลงหวี่ (Dermauw & Van Leeuwen, 2014) พบว่ายีน PfuABCG1 เป็น orthologous ยีนของ DmABCG15 (ยีน *white*) แต่ไม่พบยีนของหอยมุกที่เป็น orthologous กับยีนสีตา DmABCG2 (*brown*) และ DmABCG4 (*scarlet*)

ABCH

ยีนในวงศ์ย่อย ABCH ถูกพบครั้งแรกใน แมลงหวี่ ปัจจุบันยีนในวงศ์ย่อยนี้ถูกพบในอาร์โทรพอดหลายชนิด และพบในปลาบางชนิด เช่น ปลา *D. rerio* แต่ไม่พบในมนุษย์ (Jeong *et al.*, 2014) สำหรับจีโนมของหอยมุกมียีนในวงศ์ย่อยนี้เพียง 1 ยีน ข้อมูลการศึกษาหน้าที่ของยีนในวงศ์ย่อย ABCH ยังมีน้อย ส่วนใหญ่เป็นการศึกษาหน้าที่ในแมลง เช่น ในมอดแป้ง ABCH-9C ทำหน้าที่ในการขนส่งลิพิดไปที่คิวติเคิล (Broehan *et al.*, 2013) อย่างไรก็ตามเป็นไปได้ว่ายีนในวงศ์ย่อย ABCH อาจมีความสำคัญในสัตว์บางกลุ่ม เช่น ไน้ (*D. pulex*) และไรสองจุด (*Tetranychus urticae*) เพราะมียีนในวงศ์ย่อยนี้ถึง 15 และ 22 ยีน ตามลำดับ (Grbić *et al.*, 2011)

ตารางที่ 1 การระบุยีน ABC transporter ในจีโนมของหอยมุกแกลบ *Pinctada fucata*

Subfam	Gene	Status	Scaffold	Region (start-stop)	Gene model accession	AA	Predicted topology
A	PfuABCA1	I	4	c451308-483152	pfu_aug2.0_4.1_13334.t1	2156	TMD-NBD-TMD-NBD
	PfuABCA2	IC	4	490580-521534	pfu_aug2.0_4.1_13335.t1	2078	TMD-NBD-TMD-NBD
	PfuABCA3	C	1298	c59884-100954	pfu_aug2.0_1298.1_28189.t1	2028	TMD-NBD-TMD-NBD
	PfuABCA4	N(Join)	3782	c36414-54050	pfu_aug2.0_3782.1_09225.t1	1375	TMD-NBD-TMD-NBD
				2058	70803-76309		
	PfuABCA5	NI	1743	c16477-45546	pfu_aug2.0_1743.1_11839.t1	1830	TMD-NBD-TMD-NBD
	PfuABCA6	IC	702	131270-160778	pfu_aug2.0_702.1_07811.t1	1487	TMD-NBD-TMD-NBD
	PfuABCA7	NI	1309	c48935-91731	pfu_aug2.0_1309.1_31604.t1	1443	TMD-NBD-TMD-NBD
	PfuABCA8	IC(PSE)	1309	c102251-116429	pfu_aug2.0_1309.1_31605.t1	1475	TMD-NBD-TMD-NBD
	PfuABCA9	I	1797	44460-65535	pfu_aug2.0_1797.1_25153.t1	1601	TMD-NBD-TMD-NBD
PfuABCA10	I	1089	c61464-77638	pfu_aug2.0_1089.1_31423.t1	1603	TMD-NBD-TMD-NBD	
B	PfuABCBf1	Full	322	286779..315452	pfu_aug2.0_322.1_07360.t1	1371	TMD-NBD-TMD-NBD
	PfuABCBf2	NC	7772	c1-12257	pfu_aug2.0_7772.1_09631.t1	571	N/A
	PfuABCBf3	I	1213	c39757-79922	pfu_aug2.0_1213.1_11520.t1	1371	TMD-NBD-TMD-NBD
	PfuABCBf4	NC	5815	c11435-23978	pfu_aug2.0_5815.1_19466.t1	610	N/A

ตารางที่ 1 (ต่อ) การระบุยีน ABC transporter ในจีโนมของหอยมุกแกลบ *Pinctada fucata*

Subfam	Gene	Status	Scaffold	Region (start-stop)	Gene model accession	AA	Predicted topology
B	PfuABCBf5	Full	1121	61716-91491	pfu_aug2.0_1121.1_04831.t1	1086	TMD-NBD-TMD-NBD
	PfuABCBh1	Full	1446	68913..81605	pfu_aug2.0_1446.1_21626.t1	752	TMD-NBD
	PfuABCBh2	Full(Join)	5033	14850-32607	pfu_aug2.0_5033.1_12744.t1	718	TMD-NBD
			2080	339-14444	pfu_aug2.0_2080.1_01981.t1		
	PfuABCBh3	Full	2245	c79642-91508	pfu_aug2.0_2245.1_18742.t1	787	TMD-NBD
	PfuABCBh4	Full	3205	56048-64684	pfu_aug2.0_3205.1_19056.t1	755	TMD-NBD
	PfuABCBh5	N	8377	347-7479	pfu_aug2.0_8377.1_26277.t1	302	TMD-NBD
	PfuABCBh6	Full	1572	c38768-57197	pfu_aug2.0_1572.1_08450.t1	836	TMD-NBD
	PfuABCBh7	N	8098	c1210-10689	pfu_aug2.0_8098.1_29611.t1	437	TMD-NBD
	PfuABCBh8	Full(Join)	4670	25694-31861	pfu_aug2.0_4670.1_02652.t1	841	TMD-NBD
			1572	216-26693	pfu_aug2.0_1572.1_08449.t1		
	PfuABCBh9	Full	10	c361810-372095	pfu_aug2.0_10.1_00020.t1	775	TMD-NBD
	PfuABCBh1	Full	231	353919-375004	pfu_aug2.0_231.1_03851.t1	683	TMD-NBD
0							
C	PfuABCC1	I	1123	c14015-64631	pfu_aug2.0_1123.1_11448.t1	1320	TMD-NBD-TMD-NBD
	PfuABCC2	I	272	20034-47726	pfu_aug2.0_272.1_07270.t1	1168	TMD-NBD-TMD-NBD
	PfuABCC3	I(Join)	485	268282-281994	pfu_aug2.0_485.1_17483.t1	1114	N/A
			978	175816-207112	pfu_aug2.0_978.1_27956.t1		
	PfuABCC4	Full	307	c282576-319367	pfu_aug2.0_307.1_23847.t1	1392	TMD-NBD-TMD-NBD
	PfuABCC5	I	1208	30436-87632	pfu_aug2.0_1208.1_28121.t1	1398	TMD-NBD-TMD-NBD
	PfuABCC6	I	360	87804-139437	pfu_aug2.0_360.1_00649.t1	1551	TMD-NBD-TMD-NBD
	PfuABCC7	I	360	106458-139437	pfu_aug2.0_360.1_00649.t1	1551	TMD-NBD-TMD-NBD
	PfuABCC8	NI	1829	c3045-13926	pfu_aug2.0_1829.1_31926.t1	1093	TMD-NBD-TMD-NBD
	PfuABCC9	I	1829	c3045-21002	pfu_aug2.0_1829.1_31926.t1	1525	TMD-NBD-TMD-NBD
	PfuABCC10	I	360	c78470-104654	pfu_aug2.0_360.1_00648.t1	1552	TMD-NBD-TMD-NBD
	PfuABCC11	I	796	c46646-69270	pfu_aug2.0_796.1_21157.t1	1551	TMD-NBD-TMD-NBD
	PfuABCC12	NIC	3405	16875-31536	N/A	750	N/A
	PfuABCC13	IC	2568	39407-63565	pfu_aug2.0_2568.1_28865.t1	965	N/A
	PfuABCC14	NC	6227	c263-19953	pfu_aug2.0_6227.1_26146.t1	745	N/A
	PfuABCC15	I	591	14498-37989	pfu_aug2.0_591.1_04371.t1	1245	TMD-NBD-TMD-NBD
	PfuABCC16	I	97	c289375-298531	pfu_aug2.0_97.1_23444	1472	TMD-NBD-TMD-NBD
	PfuABCC17	I	97	c302398-310616	pfu_aug2.0_97.1_23445	1391	TMD-NBD-TMD-NBD
	PfuABCC18	N	97	c320462-331850	pfu_aug2.0_97.1_23446.t1	1269	TMD-NBD-TMD-NBD
	PfuABCC19	NI	1528	c76798-94112	pfu_aug2.0_1528.1_28349.t1	918	TMD-NBD-TMD-NBD
PfuABCC20	I	595	160782-198128	pfu_aug2.0_595.1_17623.t1	1565	TMD-NBD-TMD-NBD	
D	PfuABCD2	Full	1240	22575-30824	pfu_aug2.0_1240.1_01493.t1	737	TMD-NBD
	PfuABCD3	IC	4	c251300-266030	pfu_aug2.0_4.1_13322.t1	569	TMD-NBD

ตารางที่ 1 (ต่อ) การระบุยีน ABC transporter ในจีโนมของหอยมุกแกลบ *Pinctada fucata*

Subfam	Gene	Status	Scaffold	Region (start-stop)	Gene model accession	AA	Predicted topology
	PfuABCD4	NI	892	c24470-48556	pfu_aug2.0_892.1_07987.t1	509	TMD-NBD
E	PfuABCE1	I	425	c114873-131442	pfu_aug2.0_425.1_17413.t1	551	NBD-NBD
F	PfuABCF1	I	3615	4924-18092	pfu_aug2.0_3615.1_19150.t1	650	NBD-NBD
	PfuABCF2	I	1873	83712-92524	pfu_aug2.0_1873.1_11916.t1	501	NBD-NBD
	PfuABCF3	Full	274	c97970-112677	pfu_aug2.0_14025.1_19834	708	NBD-NBD
G	PfuABCG1	I(Join)	1148	25004-35649	pfu_aug2.0_1148.1_28093.t1	549	NBD-TMD
			4770	2976-10121	pfu_aug2.0_4670.1_02652.t1		
	PfuABCG2	I	366	231735-250195	pfu_aug2.0_366.1_20674.t1	560	NBD-TMD
	PfuABCG3	I	366	c297934-288036	pfu_aug2.0_366.1_20676.t1	444	NBD-TMD
	PfuABCG4	Full	366	274582-285860	pfu_aug2.0_366.1_20675	619	NBD-TMD
	PfuABCG5	I	366	c213148-224586	pfu_aug2.0_366.1_20673.t1	520	NBD-TMD
	PfuABCG6	Full	6	c438006-455350	pfu_aug2.0_6.1_20030.t1	656	NBD-TMD
	PfuABCG7	I	712	63501-82483	pfu_aug2.0_712.1_07821.t1	619	NBD-TMD
	PfuABCG8	I	1044	c51622-62423	pfu_aug2.0_1044.1_14741.t1	509	NBD-TMD
	PfuABCG9	Full	609	c251260-273297	pfu_aug2.0_609.1_30980.t1	661	NBD-TMD
	PfuABCG10	I	281	c152364-143924	pfu_aug2.0_281.1_03925.t1	629	NBD-TMD
	PfuABCG11	I	311	25818-52158	pfu_aug2.0_311.1_03973.t1	889	NBD-TMD
PfuABCG12	Full	311	c14284-23186	pfu_aug2.0_311.1_03972.t1	649	NBD-TMD	
H	PfuABCH1	IC	1489	c93623-117789	pfu_aug2.0_1489.1_31714.t1	461	NBD-TMD

หมายเหตุ Full = Can annotation all length of gene, N = N-terminal missing sequence, C = C-terminal missing sequence, I = Internal missing sequence

สรุปผลการวิจัย

การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้คณะผู้วิจัยสามารถระบุยีนวงศ์ ABC transporter ในหอยมุกแกลบ (*Pinctada fucata*) ได้ทั้งหมด 65 ยีน (ประกอบด้วย 8 วงศ์ย่อย ได้แก่ ABCA ถึง ABCH มีจำนวนสมาชิก 10 15 20 3 1 3 12 และ 1 ยีน ตามลำดับ) และทำนายหน้าที่ของบางยีนจากความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการกับยีนที่ทราบหน้าที่แล้วในสัตว์อื่น ยีนในวงศ์ย่อย ABCB, ABCC และ ABCG น่าจะมีบทบาทสำคัญในการปรับตัวที่เกี่ยวข้องกับการกำจัดสารพิษออกจากเซลล์ของหอยมุกแกลบ เนื่องจากพบการเพิ่มจำนวนยีนแบบจำเพาะกับชนิดที่เด่นชัด โดยเฉพาะในวงศ์ย่อย ABCC (15 ยีน) งานวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์ต่อการศึกษานี้ของยีนวงศ์นี้ในหอยมุกและหอยชนิดอื่น ซึ่งจะช่วยให้เข้าใจกลไกการต้านสารพิษในสิ่งแวดล้อมของหอยได้ดียิ่งขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559

เอกสารอ้างอิง

- Alaimo, C., Catrein, I., Morf, L., Marolda, C.L., Callewaert, N., Valvano, M.A., Feldman, M.F. & Aebi, M. (2006). Two distinct but interchangeable mechanisms for flipping of lipid-linked oligosaccharides. *The EMBO Journal*, 25(5), 967-976.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., & Lipman, D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25(17), 3389-3402.
- Andersen, D.S., & Leever, S.J. (2007). The essential Drosophila ATP-binding cassette domain protein, pixie, binds the 40 S ribosome in an ATP-dependent manner and is required for translation initiation. *Journal of Biological Chemistry*, 282(20), 14752-14760.
- Annalo, T., Chen, Z.Q., Shulenin, S., Costantino, J., Thomas, L., Lou, H., Stefanov, S. & Dean, M. (2006). Evolution of the vertebrate ABC gene family: analysis of gene birth and death. *Genomics*, 88(1), 1-11.
- Barthelme, D., Dinkelaker, S., Albers, S.V., Londei, P., Ermler, U., & Tampé, R. (2011). Ribosome recycling depends on a mechanistic link between the FeS cluster domain and a conformational switch of the twin-ATPase ABCE1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(8), 3228-3233.
- Birney, E., Clamp, M., & Durbin, R. (2004). GeneWise and genomewise. *Genome Research*, 14(5), 988-995.
- Bisbal, C., Martinand, C., Silhol, M., Lebleu, B., & Salehzada, T. (1995). Cloning and characterization of a RNase L inhibitor. A new component of the interferon-regulated 2-5 A pathway. *Biol. Chem*, 270, 13308-13317.
- Broehan, G., Kroeger, T., Lorenzen, M., & Merzendorfer, H. (2013). Functional analysis of the ATP-binding cassette (ABC) transporter gene family of *Tribolium castaneum*. *BMC Genomics* 14, 6.
- Cai, S.Y., Soroka, C.J., Ballatori, N., & Boyer, J.L. (2003). Molecular characterization of a multidrug resistance-associated protein, Mrp2, from the little skate. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 284, R125–R130.
- Cole, S.P., & Deeley, R.G. (2006). Transport of glutathione and glutathione conjugates by MRP1. *Trends Pharmacol. Sci*, 27, 438-446.
- Dawson, R.J., & Locher, K.P. (2006). Structure of a bacterial multidrug ABC transporter. *Nature*, 443(7108), 180.
- Dean, M., Hamon, Y., & Chimini, G. (2001). The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Journal of Lipid Research*, 42, 1007–17.
- Decottignies, A., & Goffeau, A. (1997). Complete inventory of the yeast ABC proteins. *Nat Genet*, 15, 137-145.
- Deeley, R.G., Westlake, C., & Cole, S. (2006). Transmembrane transport of endo- and xenobiotics by the ATP binding cassette multidrug resistance proteins (MRP). *Physiol Rev*, 86, 849-899.
- Dermauw, W., & Van Leeuwen, T. (2014). The ABC gene family in arthropods: comparative genomics and role in insecticide transport and resistance. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 45, 89-110.

- Grbić, M., Van Leeuwen, T., Clark, R.M., Rombauts, S., Rouzé, P., Grbić, V., Osborne, E.J., Dermauw, W., Ngoc, P.C.T., Ortego, F., Hernández-Crespo, P., Diaz, I., Martinez, M., Navajas, M., Sucena, E., Magalhães, S., Nagy, L., Pace, R. M., Djuranović, S., Smagghe, G., Iga, M., Christiaens, O., Veenstra, J. A., Ewer, J., Villalobos R. M., Hutter J. L., Hudson, S. D., Velez, M., Yi, S. V., Zeng, J., Pires-daSilva, A., Roch, F., Cazaux, M., Navarro, M., Zhurov, V., Acevedo, G., Bjelica, A., Fawcett, J. A., Bonnet, E., Martens, C., Baele, G., Wissler, L., Sanchez-Rodriguez, A., Tirry, L., Blais, C., Demeestere, K., Henz, S. R., Gregory, T. R., Mathieu, J., Verdon, L., Farinelli, L., Schmutz, J., Lindquist, E., Feyereisen, R., & Van de Peer, Y. (2011). The genome of *Tetranychus urticae* reveals herbivorous pest adaptations. *Nature*, 479(7374), 487.
- Gottesman, M.M., Fojo, T., & Bates, S.E. (2002). Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer*, 2, 48-58.
- Hassel, B.A., Zhou, A., Sotomayor, C., Maran, A., & Silverman, R.H. (1993). A dominant negative mutant of 2-5A-dependent RNase suppresses antiproliferative and antiviral effects of interferon. *EMBO J*, 12, 3297-3304.
- Higgins, C. F. (1992). ABC transporters: from microorganisms to man. *Annual Review of Cell Biology*, 8(1), 67-113.
- Higgins, E.T. (1998). Promotion and prevention: Regulatory focus as a motivational principle. In *Advances in Experimental Social Psychology* (Vol. 30, pp. 1-46). Academic Press.
- Higgins, C.F., & Linton, K.J. (2004). The ATP switch model for ABC transporters. *Nature Structural and Molecular Biology*, 11(10), 918.
- Higgins, C.F. (2007). Multiple molecular mechanisms for multidrug resistance transporters. *Nature*, 446(7137), 749.
- Jeong, C.B., Kim, B.M., Lee, J.S., & Rhee, J.S. (2014). Genome-wide identification of whole ATP-binding cassette (ABC) transporters in the intertidal copepod *Tigriopus japonicus*. *BMC Genomics*, 15(1), 651.
- Jeong, C.B., Kim, H.S., Kang, H.M., Lee, Y.H., Zhou, B., Choe, J., & Lee, J.S. (2017). Genome-wide identification of ATP-binding cassette (ABC) transporters and conservation of their xenobiotic transporter function in the monogonont rotifer (*Brachionus koreanus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, 21, 17-26.
- Jones, P., Binns, D., Chang, H.Y., Fraser, M., Li, W., McAnulla, C., McWilliam, H., Maslen, J., Mitchell, A., Nuka, G., Pesseat, S., Quinn, A. F., Sangrador-Vegas, A., Scheremetjew, M. Yong, S. Y., Lopez, R., & Hunter, S. (2014). InterProScan 5: genome-scale protein function classification. *Bioinformatics*, 30(9), 1236-1240.

- Kanjanachatee, K., Piyathamrongrut, K., & Rativat, V. (2004). The culture of pearl oysters, *Pinctada fucata* (Gould, 1850) in Phuket with temperature shock method and survival rates on various feeds. *Songklanakarin J. Sci. Technol*, 27, 1-16.
- Katoh, K., & Standley, D.M. (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution*, 30(4), 772-780.
- Kingtong, S., Chitramvong, Y., & Janvilisri, T. (2007). ATP-binding cassette multidrug transporters in Indian-rock oyster *Saccostrea forskali* and their role in the export of an environmental organic pollutant tributyltin. *Aquatic Toxicology*, 85(2), 124-132.
- Kurelec, B. (1992). The multixenobiotic resistance mechanism in aquatic organisms. *Crit Rev Toxicol*, 22, 23-43.
- Leslie, E.M. (2012). Arsenite-glutathione conjugate transport by the human multidrug resistance proteins (MRPs/ABCCs). *Inorg Biochem*, 108, 141-149.
- Luedeking, A., & Koehler, A. (2004). Regulation of expression of multixenobiotic (MXR) genes by environmental factors in the blue mussel *Mytilus edulis*. *Aquat Toxicol*, 69, 1-10.
- McFadzen, I., Eufemia, N., Heath, C., Epel, D., Moore, M.N., & Lowe, D. (2000). Multidrug resistance in the embryos and larvae of the mussel *Mytilus edulis*. *Mar Environ Res*, 50, 319-323.
- Miller, D.S., Graeff, C., Droulle, L., Fricker, S., & Fricker, G. (2002). Xenobiotic efflux pumps in isolated fish brain capillaries. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 282, R191-R198.
- Minier, C., & Moore, M.N. (1996). Rhodamine B accumulation and MXR protein expression in mussel blood cells: effects of exposure to vincristine. *Mar Ecol Prog Ser*, 142, 165-173.
- Paytubi, S., Wang, X., Lam, Y.W., Izquierdo, L., Hunter, M.J., Jan, E., Hundal, H.S., & Proud, C.G. (2009). ABC50 promotes translation initiation in mammalian cells. *Journal of Biological Chemistry*, 284(36), 24061-24073.
- Rees, D.C., Johnson, E., & Lewinson, O. (2009). ABC transporters: the power to change. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10(3), 218.
- Reese, M.G., Eeckman, F.H., Kulp, D., & Haussler, D. (1997). Improved splice site detection in Genie. *Journal of Computational Biology*, 4(3), 311-323.
- Riout, D., Pasquier, J., Boulangé-Lecomte, C., Poret, A., Abbas, I., Marin, M., Minier C., & Le Foll, F. (2014). The multi-xenobiotic resistance (MXR) efflux activity in hemocytes of *Mytilus edulis* is mediated by an ATP binding cassette transporter of class C (ABCC) principally inducible in eosinophilic granulocytes. *Aquatic Toxicology*. 153, 98-109.
- Ronquist, F., Teslenko, M., van der Mark, P., Ayres, D. L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M.A. & Huelsenbeck, J.P. (2012). MrBayes 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology*, 61(3), 539-542.

- Sauerborn, R., Polancec, D.S., Zaja, R., & Smital, T. (2004). Identification of the multidrug resistance-associated protein (mrp) related gene in red mullet (*Mullus barbatus*). *Mar Environ Res*, 58, 199–204.
- Sheps, J.A., Ralph, S., Zhao, Z., Baillie, D.L., & Ling, V. (2004). The ABC transporter gene family of *Caenorhabditis elegans* has implications for the evolutionary dynamics of multidrug resistance in eukaryotes. *Genome Biology*, 5(3), R15.
- Smital, T., Sauerborn, R., & Hackenberger, B.K. (2003). Inducibility of the P-glycoprotein transport activity in the marine mussel *Mytilus galloprovincialis* and the freshwater mussel *Dreissena polymorpha*. *Aquatic Toxicology*, 65(4), 443-465.
- Sturm, A., Cunningham, P., & Dean, M. (2009). The ABC transporter gene family of *Daphnia pulex*. *BMC Genomics*, 10(1), 170.
- Takeuchi, T., Kawashima, T., Koyanagi, R., Gyoja, F., Tanaka, M., Ikuta, T., Shoguchi, E., Fujiwara, M., Shinzato, C., Hisata, K. & Fujie, M. (2012). Draft genome of the pearl oyster *Pinctada fucata*: a platform for understanding bivalve biology. *DNA Research*, 19(2), 117-130.
- Takeuchi, T., Koyanagi, R., Gyoja, F., Kanda, M., Hisata, K., Fujie, M., Goto, H., Yamasaki, S., Nagai, K., Morino, Y. & Miyamoto, H. (2016). Bivalve-specific gene expansion in the pearl oyster genome: implications of adaptation to a sessile lifestyle. *Zoological Letters*, 2(1), 3.
- Vasiliou, V., Vasiliou, K., & Nebert, D.W. (2009). Human ATP-binding cassette (ABC) transporter family. *Hum Genomics*, 3(3), 281-290.
- Wu, B., Torres-Duarte, C., Cole, B.J., & Cherr, G.N. (2015). Copper oxide and zinc oxide nanomaterials act as inhibitors of multidrug resistance transport in sea urchin embryos: their role as chemosensitizers. *Environmental Science & Technology*, 49(9), 5760-5770.
- Wenzel, S., Wilbraham, D., Fuller, R., Getz, E.B., & Longphre, M. (2007). Effect of an interleukin-4 variant on late phase asthmatic response to allergen challenge in asthmatic patients: results of two phase 2a studies. *The Lancet*, 370(9596), 1422-1431.
- Zaja, R., Klobucar, R.S., & Smital, T. (2007). Detection and functional characterization of Pgp1 (ABCB1) and MRP3 (ABCC3) efflux transporters in the PLHC-1 fish hepatoma cell line. *Aquat Toxicol*, 81, 365–376.