

博士論文

海産動物の二価金属イオン輸送体の機能と

進化的意義に関する研究

(Studies on the function and evolutionary significance
of divalent metal transporters in marine animals)

佐々 三依子

—目次—

序論

第一章 貝類における DMT 様遺伝子の探索・機能解析

1-1. 序論

1-2. 材料と方法

1-2-1. 生物試料

1-2-2. シチヨウシンカイヒバリガイからの DMT 様 cDNA の単離

1-2-2-2. プライマー設計

1-2-2-3. cDNA の単離

1-2-2-4. サブクローニングとインサートチェック

1-2-2-5. プラスミド抽出

1-2-2-6. シーケンシング

1-2-3. マガキからの DMT 様 cDNA の単離

1-2-3-1. RNA 抽出と cDNA 合成

1-2-3-2. プライマー設計

1-2-3-3. cDNA の単離

1-2-3-4. サブクローニングとインサートチェック

1-2-3-5. プラスミド抽出

1-2-3-6. シーケンシング

1-2-4. 膜貫通部位予測とモチーフ検索

1-2-5. 分子系統解析

1-2-6. 重金属曝露による遺伝子発現応答及び組織中の金属量測定

1-2-6-1. 生物試料

1-2-6-2. 重金属を含む溶液の作成

1-2-6-3. 重金属曝露

1-2-6-4. RNA 抽出と濃度調節

1-2-6-5. DNase 処理、cDNA 合成

1-2-6-6. プライマー・TaqMan プロブの設計

1-2-6-7. 定量的リアルタイム PCR

1-2-6-8. 重金属曝露組織中の金属量測定

1-2-6-9. 統計解析

1-3. 結果

1-3-1. シチヨウシンカイヒバリガイおよびマガキからの DMT 様 cDNA の単離

1-3-2. 膜貫通部位予想とモチーフ検索

1-3-3. 分子系統解析

1-3-4. 重金属曝露による遺伝子発現応答及び組織中の金属量測定

1-4. 考察

第二章 オニヒトデ DMT 様配列の単離と構造

2-1. 序論

2-2. 材料と方法

2-2-1. オニヒトデ DMT-1、DMT-2 の単離

2-2-1-1. 生物試料

2-2-1-2. RNA 抽出と cDNA 合成

2-2-1-3. プライマー設計

2-2-1-4. cDNA の単離

2-2-1-5. サブクローニングとインサートチェック

2-2-1-6. プラスミド抽出

2-2-1-7. 配列決定

2-2-1-8. 近隣結合法による系統解析

2-2-2. 構造解析

2-2-2-1. 膜貫通部位予測・モチーフ検索・シンテニー解析

2-2-2-2. 構造解析

2-3. 結果

2-3-1. オニヒトデ DMT、DMTRP の単離

2-3-2. 構造解析

2-3-2-1. 膜貫通部位予測・モチーフ検索・シンテニー解析

2-3-2-2. 構造解析

2-4. 考察

第三章 DMT 様配列の分子系統解析

3-1. 序論

3-2. 材料と方法

3-2-1. 微生物・植物・動物を網羅する分子系統解析

3-2-2. 動物 DMT 様配列における分子系統解析

3-3. 結果

3-3-1. 微生物・植物・動物を網羅する分子系統解析

3-3-2. 動物 DMT 様配列における分子系統解析

3-4. 考察

第四章 機能解析

4-1. 序論

4-2. 材料と方法

4-2-1. 電気生理学的解析

4-2-1-1. コンストラクトの作成

4-2-1-2. cDNA 合成

4-2-1-3. 溶液の作成

4-2-1-4. 卵母細胞の単離

4-2-1-5. 卵細胞への cRNA の注入

4-2-1-6. 2 電極膜電位固定法

4-2-1-7. データ処理

4-2-2. 酵母を用いた発現系

4-2-2-1. 酵母

4-2-2-2. 発現ベクター

4-2-2-3. 形質転換

4-2-2-4. 発現局在

4-2-2-5. スポットアッセイ

4-2-2-6. 金属取込量測定

4-3. 結果

4-3-1. 電気生理学的解析

4-3-2. 発現局在

4-3-3. スポットアッセイ

4-3-4. 金属取込量測定

4-4. 考察

総合考察

謝辞

引用文献

序論

本研究では、海に溶け込んでいる成分のなかで、金属イオンに着目した。海には多くの金属イオンが存在し、そのなかには生命活動への影響が大きいものが含まれる (Obata et al., 2017, Moore et al., 2013)。例えば亜鉛や銅は、様々な生理過程に関与する微量必須元素であり、生物は適切に体内に取り込む必要がある。一方でカドミウムや鉛の生物学的な役割は不明で、むしろ有害な性質が知られている (M Kalay, 2000)。また、微量必須元素であっても、一定濃度を超えると生体にとって有害となる (Migliaccio et al., 2014, 2015)。このため、海洋で生息するためには、周辺に存在する金属のうち、必要なものを必要な量だけ取り込み、不必要なものは取り込まないようにする、精密な制御が不可欠である。そのうえ、海洋生物の金属調節システムは多様に分化している。たとえば、一般的な生物では微量必須元素ではない金属が一部の海洋生物の体内から検出されていたり (Yilmaz et al., 2017)、カドミウムを亜鉛の代替として利用する海洋細菌も報告されている (Xu et al., 2008)。

以上のように、海には多様な金属が溶け込んでおり、海に棲む生物の金属の取り込み制御機構も多様であると考えられる。しかし、海の動物、とくにそのほとんどを占める無脊椎動物の金属制御に関する知見は極めて乏しい。そこで本研究では、生物が細胞に金属を取り込む輸送体を手掛かりとして、海産無脊椎動物の金属制御を解明しようと考えた。

二価金属イオン輸送体

6

過させる輸送体も存在する。本研究では、二価金属を幅広く輸送することが知られている二価金属イオン輸送体 DMT (divalent metal transporter) に注目した。

DMT はプロトン濃度勾配を駆動力とする共輸送体であり (Nevo & Nelson, 2006, Tandy et al., 2000) 輸送体の分類としては、SLC (Solute Carrier) スーパーファミリーの SLC11 ファミリーに属する。DMT は、細菌からヒトまで多くの生物種において存在が確認されており、多種多様な金属イオンを輸送することがいくつかの種において報告されている (Cellier et al., 1995)。例えば、Natural resistance-associated macrophage protein 2 (Nramp2) あるいは DMT1 と呼ばれるラットの DMT は、鉄 Fe^{2+} 、マンガン Mn^{2+} 、コバルト Co^{2+} 、亜鉛 Zn^{2+} 、カドミウム Cd^{2+} 、銅 Cu^{2+} 、ニッケル Ni^{2+} 、鉛 Pb^{2+} を輸送することが、アフリカツメガエル卵母細胞に発現させ、電気生理学的な解析を行うことにより示唆された (Gunshin et al., 1997)。また、放射性同位体により標識した金属イオンの細胞内への取り込み量の測定により、ラット・ヒトおよび酵母の DMT が、 Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Cu^{2+} の細胞内に輸送に関与することが確認された (Sacher, 2001, Marciani et al., 2004, Okubo et al., 2003)。しかし、様々な金属を輸送できる特性はあるものの、ヒトの組織における DMT1 の最大の輸送対象は Fe^{2+} であると考えられており、細胞内 Fe^{2+} 濃度の恒常性維持のために細胞内 Fe^{2+} 濃度に応じて発現することもわかっている (Radisky & Kaplan, 1999)。

DMT の多様性

多様な生物において存在が報告されている DMT であるが、それぞれの生物がもつ DMT の系統関係は十分にはわかっていない。最も研究例が多い哺乳類については、上記で述べた Nramp2 (DMT1) 以外に、感染症や自己免疫疾患に対するマクロファージの活性化を制御し、構造上も Nramp2 と似た Nramp1 が存在する (Blackwell et al., 2000)。輸送体の名称としては、Nramp1 は SLC11A1、Nramp2 は SLC11A2 と呼ばれている。Nramp1 は哺乳類のみから報告されており、真骨魚類には Nramp1 は存在しないことがゲノム解析からあきらかになっている。一方魚類には、三度目の全ゲノム重複 (3R) において生じた別の DMT 様遺伝子が保存されており、この遺伝子は Nramp1 と類似の機能を保持している (Neves et al., 2011)。植物においてはより多くの DMT 様パラログが確認されており、特定の金属の輸送や異なる組織での分布といった様々な機能を担っている (Ullah et al., 2018, Qin et al., 2017)。このように、DMT は環境に応じた生理的プロセスに対応するために様々な系統において多様化してきたと考えられる。

一方、海洋無脊椎動物の DMT については、海洋環境という金属イオンの多い環境に生息

しているにもかかわらず、これまでほとんど報告がない。唯一の報告例として、近年ホタテガイから DMT 様の輸送体（ホタテガイ DMT）の cDNA が単離された。ホタテガイ DMT はカルシウム Ca^{2+} を輸送することができ、その遺伝子発現が細胞内 Fe^{2+} 濃度に相関しないことなど、哺乳類の DMT1 とは異なる性質を持つことより、貝殻形成に関与している可能性が示唆された (Toyohara et al., 2005)。

本研究の研究対象

本研究では、貝類とヒトデを研究対象として選んだ。貝類は浅海、深海、淡水、そして陸上まで多様な環境に生息している。淡水や汽水に生息する貝であれば、水中のカルシウム不足により貝殻形成が困難になり、海洋汚染の著しい海域や、深海の熱水噴出域などでは重金属に曝露されるなど、その多様な環境への適応には金属イオンの制御が必須であるといえる。それにもかかわらず、貝類はそれらの多様な環境への適応に成功し、地球上で最も繁栄している生物の一つであると言われている (佐々木, 2010)。例えば、世界中の温帯の海に広く生息するムラサキイガイは、金属を含む環境中の汚染物質に耐性を持ち、吸収・蓄積することから、沿岸水域の人為的な汚染傾向を監視する、環境モニタリング生物としても用いられている (Beyer et al., 2017)。深海の熱水噴出域の近傍は、暗闇・高水圧・変化の大きい温度・高濃度の重金属といった過酷な環境であるにも関わらず、シンカイヒバリガイ類が生息している (Sun et al., 2017)。またマガキは、適応可能な塩分の広さや、金属を濃縮するという性質から、河口域におけるバイオインディケーターとしても用いられている (Li et al., 2020)。このように、貝類は、多様な金属環境に適応する制御を進化させていると考えられる。

一方ヒトデの属する棘皮動物は、世界中の海の底の生態系に優占する生物群である (Mohammad et al., 2018)。棘皮動物はすべてが海産であり、その中でもオニヒトデ *Acanthaster planci* は、ゲノム配列がかなり正確に読まれており、海洋生物の遺伝子を研究する上でも貴重な生物である (Hall et al., 2017)。オニヒトデはサンゴに対する食害が有名であり、多様なアプローチによってオニヒトデに対する理解を深めるための研究がおこなわれている (Caballes & Pratchett, 2017, Ling et al., 2020)。その一方で、読まれているゲノム配列が桁違いに高解像度であることから、進化発生研究においても重要とされている (Baughman, 2018)。このように、オニヒトデゲノムは海洋生物の中でも、バイオインフォマティクスのアプローチが容易である。また、前口動物である貝類とは異なり、棘皮動物は後口動物であることから、両者に注目することで進化的により有意義な考察が可能であると考えられる。

以上の理由より、本研究においては貝類とオニヒトデを研究対象種として選択した。

本研究の構成

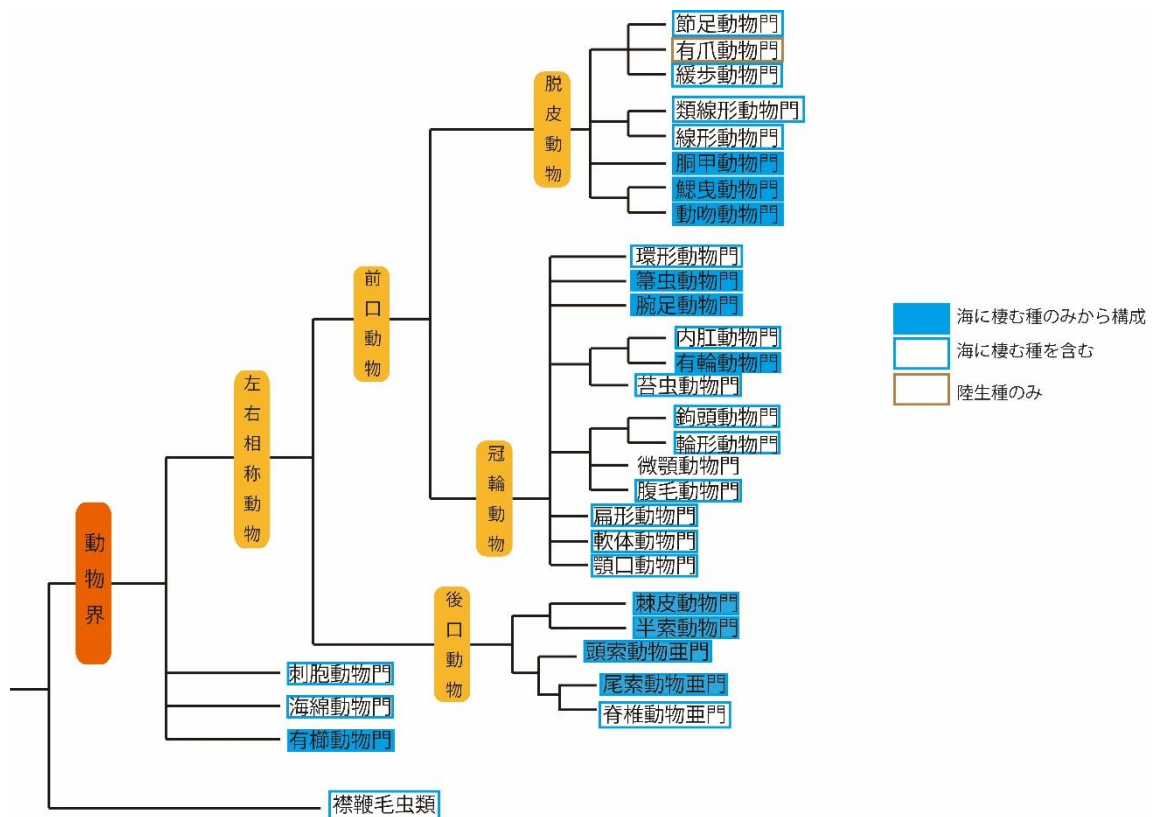
本研究では、まず二枚貝類の環境適応における DMT の機能を解明するために、イガイ科二枚貝類であるシチヨウシンカイヒバリガイ *Bathymodiolus septemdierum* およびマガキ *Crassostrea gigas* を研究対象に選び、DMT の単離および機能解析を試みた（第一章）。その結果、シチヨウシンカイヒバリガイおよびマガキから、それぞれ二つずつの DMT 様配列の取得に成功した。両者を用いて分子系統解析を行った結果、これらは異なるクレードに属し、片方は既知のヒト DMT 等と同じクレードに属したが、もう一方は独立したクレードを形成した。この得られた二つのクレードを DMT-1 と DMT-2 として、重金属曝露による遺伝子発現応答解析・組織内金属濃度測定を行った。しかしこれら解析によって、明確な傾向を見出すことはできなかった。そこで第二章以降において、精密なゲノム配列が発表され、RNA-seq データも公開されているオニヒトデを対象生物とした。

第二章においてオニヒトデにおける探索を行った結果、同種においても二つの DMT 様配列（ApDMT-1 と ApDMT-2）の単離に成功し、これらの DMT 様配列 ApDMT-1 および ApDMT-2 の構造・機能解析を試みた。また、立体構造の 3D モデルを作成し、そのモデル上で、金属輸送における機能的に重要なアミノ酸残基と金属の距離を比較した。これらの結果は、両タンパク質の類似性を示唆し、機能に違いがあると結論付けるには至らなかった。一方システマティック解析の結果、ApDMT-1 と ApDMT-2 は同一の scaffold 上に存在していたもののその距離は 900 kb 以上離れており、これら遺伝子の分岐はとても古いことが考えられた。

そこで第三章において両遺伝子の分子進化の歴史を探るべく、オニヒトデのみならず、全ゲノムが読まれている多くの生物を対象とし、DMT 様配列がどの程度の生物において保存されているのか、その分布を把握するため、データベースを用いた探索を行った。得られた配列を用いて分子系統解析を行った結果、動物において DMT 様配列は二つのクレードに分かれることが明らかとなった。片方のクレードにはヒトやラットといった既知 DMT が含まれ、このクレードに ApDMT-2 も含まれたため、ApDMT-2 がオニヒトデの DMT であると考えられた。一方のクレードは ApDMT-1 と未知の DMT 様配列で構成されていた。このため、こちらのクレードに属する配列は新規タンパク質であると判断し、DMT に関連するなんらかのタンパク質であるとして、DMT-related protein, DMTRP と命名した。DMTRP を保有する生物は全て海産動物であった。このことから、DMTRP は海産動物特異的な輸送体であることが示された。

第四章においては、DMT と DMTRP の機能を、電気生理学的手法、酵母を用いたスポットアッセイ、および DMT および DMTRP を発現させた酵母を各種重金属を含む培地中で培養して金属取込量の測定を行うことで解析した。電気生理学的手法においては機能に関する知見は得られなかったが、スポットアッセイにより、両者の機能が異なる可能性が示された。金属取込量測定の結果、オニヒトデ DMT は既報の DMT において輸送が報告されている金属に関して、細胞内濃度を上昇させる傾向が見られたが、オニヒトデ DMTRP は、金属濃度、とくに亜鉛の細胞内濃度を低下させることが明らかとなった。

以上の研究で得られた結果から、総合考察では、DMT と DMTRP の誕生とその機能的意義について検討した。また、いくつかの動物群における DMTRP の喪失と、DMTRP を保持する生物が全て海産動物であったことから、その喪失が淡水や陸上への分布域の拡大に与えた影響などについて、構造・機能・生態・進化など多様な観点から検討を行った。



図序-1. 動物の系統関係のうち、海に棲む種のみから構成される動物門や亜門、海に棲む種を含む動物門や亜門および陸生種のみからなる動物門を示した図。動物の系統関係は西川 (2013) 生物の科学遺産 67: 89-94 に従った。

第一章

貝類における DMT 様遺伝子の探索・機能解析

1-1. 序論

海産無脊椎動物の DMT に関する知見は極めて乏しい。本章では、様々な金属濃度の水圏環境に分布する無脊椎動物である貝類において DMT の存在を cDNA クローニングや遺伝子解析により確認し、また、確認された DMT の機能の解明を試みた。研究対象として、シチヨウシンカイヒバリガイ *Bathymodiolus septemdierum* およびマガキ *Crassostrea gigas* を選択した。

シチヨウシンカイヒバリガイについて

シチヨウシンカイヒバリガイ *Bathymodiolus septemdierum* (図 1-1, 1-2) は、伊豆・小笠原弧の深海の熱水噴出域の優占種として知られるイガイ科二枚貝類である。熱水噴出域は、海底面下に染み込んだ海水がマグマに加熱されて上昇し、海底から噴出する場所である。熱水噴出域では高水圧のため海水は液体のまま 300~400℃ に達する。高温の熱水は岩石や堆積物中の鉱物や火山ガスの成分を溶解して取り込んだり、逆に鉱物を形成させて海水に含まれていた一部の元素を除去する。これらのプロセスを経て深海底から噴出する熱水は、還元性物質に富み pH が低く、また金属元素成分を多く含む、といった特徴を持つ (藤倉ほか 2012)。このように、熱水噴出域の環境は生物にとって十分過酷であるが、それにも関わらず、そこにはサンゴ礁にも匹敵するバイオマスを持つ生物群集が存在する (井上・小糸 2010)。これら生物群集を支えているのが、熱水中に含まれる硫化水素 H_2S やメタン CH_4 を利用して有機物を合成する化学合成細菌である。熱水噴出域で巨大なバイオマスを占めるシチヨウシンカイヒバリガイは、鰓細胞内に硫黄酸化細菌を共生させ、細菌が合成した栄養分を得て生活しているが、化学合成に必要な化学物質を豊富に得るために有害物質の噴出する熱水噴出孔に可能な限り近づく必要がある。このため、本種は、熱水に溶解して、あるいは微粒子となって降り注ぐ重金属 (大越 2010) に対する適応機構が発達していることが予想される。実際、シンカイヒバリガイ類は、環境中の重金属濃度に応じた濃度の重金属濃縮を行うことが知られているが (Koschinsky et al., 2014)、その重金属の収集過程や濃縮の方法は明らかになっていない。また、炭酸カルシウム結晶の形成に不利な酸性環境において、シンカイヒバリガイ類がカルシウムを集めて貝殻を形成するしくみについてもよくわかっていない。

マガキについて

マガキ *Crassostrea gigas* (図 1-3) はイタボガキ科マガキ属の二枚貝である。本種は温度や塩分・金属濃度などの環境条件が過酷かつダイナミックに変化する河口域や潮間帯に生息

する付着生物であるが、殻が基盤に強固に接着する性質上、一旦付着したのちはその場所から動くことができず、環境変化には生理的に適応する必要がある (Wang et al., 2012)。マガキは 2012 年に全ゲノム配列が解読されており、ゲノム情報へのアクセスが可能である (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/10758>)。

これらの種を対象として、まず PCR 法による DMT 様配列 cDNA の単離を試みた。次に、得られた配列を用いて、膜貫通部位の予測・モチーフ検索および分子系統解析を行った。また、シチヨウシンカイヒバリガイおよびマガキを実際に重金属を含む人工海水中で飼育し、DMT 様配列の mRNA 量の変化を、リアルタイム PCR により測定した。さらに、この実験時に得られた組織中の重金属量を、ICP-MS によって測定した。

1-2. 材料と方法

1-2-1. 生物試料

本研究において用いたシチヨウシンカイヒバリガイは、『なつしま』研究航海 NT05-06 および NT14-06 において、独立行政法人海洋研究開発機構 (JAMSTEC) の無人探査船「ハイパードルフィン」により、伊豆小笠原海域の水深約 1,200~1,400 m にある明神海丘 (32°06'N 139°53'E) (図 1-4) の熱水噴出域から採取された。試料は採取後、船上でただちに解剖したのち、使用まで -80°C で凍結保存した。

マガキは、東京都築地市場において生食用として販売されていた、兵庫県室津海域において採取された個体を用いた。購入後直ちに解剖し、液体窒素によって急速冷凍し、使用まで -80 °C において凍結保存した。

1-2-2. シチヨウシンカイヒバリガイからの DMT 様 cDNA の単離

1-2-2-1. RNA 抽出と cDNA 合成

Total RNA は組織 (エラ、図 1-5) より ISOGEN (Nippon Gene Co., Tokyo, Japan) を用いて抽出した。NT05-06 で採取したサンプルに関して、Poly-A RNA を Oligotex dT30 (Takara Bio Inc., Shiga, Japan) を用いて精製した後、90ng の Poly-A RNA から SMART cDNA Library Construction Kit (Takara Bio USA, Inc. Mountain View, CA, USA) を用い、添付のプロトコールに従って 50μL の反応系を用いて LD PCR 法 (20 サイクル) により cDNA 合成を行った。NT14-06 において採取したサンプルに関しては、2 μg のエラの Total RNA より、SMART cDNA Library Construction Kit (Takara Bio USA) を用いて二重鎖 cDNA プールを合成した。組織特異性を調べるために、Super Script II (Thermo Fisher Scientific, Inc. Waltham, MA, USA)

を用いて逆転写反応を行った。用いた組織は、閉殻筋、足糸牽引筋、足、エラ、生殖腺、外套膜である。

1-2-2-2. プライマー設計

作成したプライマーの一覧は、表 1-1 で示す。

部分配列取得のためのプライマーは、シチヨウシンカイヒバリガイと近縁であるヨーロッパイガイ (*Mytilus edulis*) の EST データベースで見つかった DMT 様配列をコードする配列と、データベースから得たマガキの DMT-1 様 cDNA 配列をアライメントして、塩基配列の保存性の高い領域から、1 種類のフォワードおよびリバースのプライマー、tDMT-Mg-F および tDMT-Mg-R を作成した。得られた部分配列に特異的なプライマー tDMT-Bs-F および tDMT-Bs-R を作成し、また、アコヤガイゲノムデータベース上で、マガキ cDNA 配列を質問配列として行った BLAST (tblastn) において相同性が認められた配列断片を整理し、相同性の高かった部分でそれぞれ 2 種類ずつのフォワードおよびリバースの縮重プライマー pearl-DMT-F1, pearl-DMT-F2, pearl-DMT-R1 および pearl-DMT-R2 を設計した。解析過程で使ったその他のプライマーについては、以下の項で適宜記述する。なお、DMT 様配列が 2 つあることが推測されたため、本章では以降それぞれ BsDMT-1 と BsDMT-2 と称する。

1-2-2-3. cDNA の単離

BsDMT-2 単離に関する手法を記述する。1-2-2-1. において作成した cDNA より、反応液 0.5 μ L をテンプレートとし、ExTaq (Takara Bio Inc.) による Nested PCR を行った。PCR 反応液の組成は Inoue et al. (2003) に従った。プライマーの配列は、Toyohara et al. (2005) に従った。1 段目の反応は、プライマー DMT3 および DMT7 を用いて、94 $^{\circ}$ C 1 分の加熱後、酵素を加え、94 $^{\circ}$ C 30s、58 $^{\circ}$ C \sim 48 $^{\circ}$ C (1 サイクルごとに 1 $^{\circ}$ C ずつ温度低下) 20s、72 $^{\circ}$ C 75s の温度セットを 10 サイクルのタッチダウン PCR の後に、アニーリング温度を 48 $^{\circ}$ C に固定して 30 サイクルの反応を行い、最後に 72 $^{\circ}$ C で 7 分保温後、4 $^{\circ}$ C に下げて反応を停止した。次に、1 段目の反応液 1 μ L をテンプレートとし、プライマー DMT3 および DMT6 を用いて、同様の反応を行った。増幅された断片は、1-2-2-6. に記述する方法によって配列を決定した。

得られた配列の下流の配列を得るために、プライマー DMT-S2 を設計し、Inoue et al. (2003) に従って 3'-RACE を行った。PCR は ExTaq を用い、94 $^{\circ}$ C 1 分の加熱後、酵素を加え、94 $^{\circ}$ C で 30 秒、61 $^{\circ}$ C で 30 秒、72 $^{\circ}$ C で 105 秒の温度セットを 35 サイクルで実施した。

一方、得られた配列の上流については、プライマー DMT-A1 を設計し、Inoue et al. (2003) に従って 5'-RACE を行った結果、上流部の一部の配列が得られたが、まだ開始コドンに至

らなかったため、さらに DMT-A4 および DMT-A5 を合成して、DMT-A5 と 5'-primer を用いて第 1 段目の PCR、次に DMT-A4 と 5'-primer を用いて第 2 段目の nested PCR を行った。PCR の温度条件は、上記 3'-RACE と概ね同様であるが、両反応ともアニーリング温度を 58℃、伸長時間を 90 秒とした。得られた配列にも開始コドンが含まれなかったため、GeneRacer Kit (Thermo Fisher Scientific, Inc.) および DMT-A6 を用いて、添付のプロトコールに従い、コード領域最上流部を単離した。

次に BsDMT-1 単離に関する手法を記述する。以下に記述する PCR にはとくに記述がない限り、TAKARA Ex Taq HS (Takara Bio Inc.) DNA ポリメラーゼを用い、添付のプロトコールに従って反応液を調整した。始めに、設計したプライマー tDMT-Mg-F および tDMT-Mg-R を用いて、PCR 法により、シチヨウシンカイヒバリガイの DMT 部分配列の増幅を行った。反応条件は、98℃で 10 秒の熱変性・45℃で 30 秒のアニーリング・72℃で 30 秒の伸長反応を 32 サイクル行い、最後の伸長を 7 分間 72℃で行った。得られた PCR 産物は、1-2-2-6 に記載する手順でサブクローニングを行い、配列決定をした。

得られた配列の上流および下流の配列取得のために、テンプレートには、組織特異性を調べるために作成した、エラの cDNA プールを用いた。反応条件は、pearl-DMT-F1 と tDMT-Bs-R というプライマーの組み合わせの場合は、98℃で 10 秒の熱変性・59℃で 30 秒のアニーリング・72℃で 1 分 30 秒の伸長反応を 42 サイクル行い、最後の伸長を 7 分間 72℃で行った。pearl-DMT-F2 と tDMT-Bs-R というプライマーの組み合わせの場合は、98℃で 10 秒の熱変性・52℃で 30 秒のアニーリング・72℃で 1 分 30 秒の伸長反応を 42 サイクル行い、最後の伸長を 7 分間 72℃で行った。pearl-DMT-F2 と pearl-DMT-R2 というプライマーの組み合わせの場合は、98℃で 10 秒の熱変性・55℃で 30 秒のアニーリング・72℃で 1 分 30 秒の伸長反応を 42 サイクル行い、最後の伸長を 7 分間 72℃で行った。最上流および最下流の配列は、5'-および 3'-RACE (Rapid amplification of cDNA) による取得を試みた。5'-RACE においては、縮重リバースプライマー RACE-P-F1、RACE-P-F2 を、3'-RACE においては、縮重フォワードプライマー RACE-P-R2 を設計した。反応条件は、まず特異的プライマーでの増幅を先に進める目的で、RACE-P-F1、RACE-P-F2、RACE-P-R1 それぞれ一つずつをプライマーとして入れ、98℃で 10 秒の熱変性・50℃で 30 秒のアニーリング・72℃で 2 分の伸長反応を 38 サイクル行い、最後の伸長を 7 分間 72℃で行った。これらをテンプレートとして 5'-PCR (SMART cDNA Library Construction Kit に付属) と RACE-P-F1、5'-PCR プライマーと RACE-P-F2、CDSIIIadapt と RACE-P-R2 という組み合わせで、98℃で 10 秒の熱変性・50℃で 30 秒のアニーリング・72℃で 2 分の伸長反応を 38 サイクル行い、最後の伸長を 7 分間 72℃で行った。また、同じプライマーの組み合わせで、タッチダウン PCR として、65℃か

ら 55°C まで 0.5°C ずつ 20 サイクルをかけて温度を下げ、その後、アニーリング温度を 55°C に固定して 25 サイクルの増幅を行うことで、部分配列を取得した。

これ以降に記述するすべての PCR は、とくに記載のない限り、KOD-plus- (TOYOBO CO., Osaka, Japan) DNA ポリメラーゼを用い、添付のプロトコールに従って反応液を調製した。シチヨウシンカイヒバリガイ生殖腺から得られた二本鎖 cDNA を用いた。ここまでに得られた配列の上流および下流の配列を、5'-および 3'-RACE によりそれぞれ決定した。5'-RACE では、1-2-2-1.において合成した cDNA の 5'末端に付加された配列に特異的な 5' PCR プライマーと、上記で決定した配列から設計した特異的リバープライマー FSD-R を用いて PCR を行った。反応条件は、最初に 94°C で 2 分間変性させたのち、94°C で 15 秒の熱変性・59°C で 30 秒のアニーリング・68 秒で 1 分 30 秒の伸長反応のセットを 35 サイクル行った。その後、この PCR 産物を鋳型にして nested-PCR を行った。まず 5'末端に付加された配列に特異的な配列をもとに設計した 5' PCR inner と、BsDMT-1 遺伝子特異的リバープライマー sDMTRP-R を用いてタッチダウン-PCR 法を行った。反応条件は、最初に 94°C で 2 分間熱変性を行った後、94°C で 15 秒の熱変性・72°C で 30 秒のアニーリング・68°C で 1 分 30 秒の伸長反応のセットを 3 サイクル、94°C で 15 秒の熱変性・69°C で 30 秒のアニーリング・68°C で 1 分 30 秒の伸長反応のセットを 3 サイクル、94°C で 15 秒の熱変性・66°C で 30 秒のアニーリング・68°C で 1 分 30 秒の伸長反応のセットを 25 サイクル行い、25 サイクル目に Ex Taq DNA ポリメラーゼを添加しその後 72°C で 7 分伸長反応を行った。得られた PCR 産物は、1-2-2-4.から 1-2-2-6.に記載する手順でサブクローニングを行い、配列を決定した。

次に、3'-RACE では、BsDMT-1 遺伝子特異的フォワードプライマー FSD-F と、逆転写の際 oligo dT に付加した配列から設計した NotIADPN1 を用いて PCR を行った。反応条件は、最初に 94°C で 2 分間変性させたのち、94°C で 15 秒の熱変性・60°C で 30 秒のアニーリング・68 秒で 1 分 30 秒の伸長反応のセットを 35 サイクル行った。次に、この PCR 産物を鋳型として nested-PCR を行った。まず BsDMT-1 遺伝子特異的フォワードプライマー TSS-F と、逆転写の際、oligo dT に付加した配列から設計した NotIADPN2 を用いてタッチダウン-PCR 法を行った。反応条件は、最初に 94°C で 2 分間熱変性を行った後、94°C で 15 秒の熱変性・63°C で 30 秒のアニーリング・68°C で 1 分の伸長反応のセットを 3 サイクル、94°C で 15 秒の熱変性・60°C で 30 秒のアニーリング・68°C で 1 分の伸長反応のセットを 3 サイクル、94°C で 15 秒の熱変性・57°C で 30 秒のアニーリング・68°C で 1 分の伸長反応のセットを 25 サイクル行い、25 サイクル目に Ex Taq DNA ポリメラーゼを添加し、その後 72°C で 7 分伸長反応を行った。得られた PCR 産物は、1-2-2-4.から 1-2-2-6.に記載する手順でサブクローニングを行い、配列を決定した。

最後に、5'-UTR と 3'-UTR に設計したプライマーにより全長を増幅しようと試みたが、欠失配列を持つ配列のみが得られた。しかし、欠失部分に設計したプライマーと 5'-UTR および 3'-UTR に設計したプライマーとの間では増幅断片が得られるため、長いほうの配列も発現していることは確実である。従って、長いほうについては、5'および 3'-RACE と部分配列の PCR により得られた配列と、欠失部分から 5'および 3'-末端までの増幅産物が完全に一致し、それぞれのオーバーラップ部分は数百塩基対であることから、これらをつないだものを全長とした。

1-2-2-4. サブクローニングとインサートチェック

まず BsDMT-2 に関して記述する。1-2-2-3. で得られた PCR 産物は、1.2%アガロースゲルで分離し、予想される長さのバンドを切り出した。その後、Geneclean Kit (MP Biomedicals, Irvine, CA, USA) で切り出したゲルから DNA 断片を抽出・精製した。精製した DNA 断片は、TA-cloning 法により pT7blue vector (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) に組み込んだ。

次に BsDMT-1 に関して記述する。2-1-1-4. で得られた PCR 産物は、1%アガロースゲルを用いた電気泳動により分離し、予想される長さのバンドを切り出した。その後、QIAquick Spin (QIAGEN, Venlo, Nederland) を用いて、切り出したゲルから DNA 断片を抽出・精製した。精製した DNA 断片は、TA-cloning 法により pGEM-T Easy ベクター (Promega) に組み込んだ。Competent high DH5α (Toyobo CO.) を用いた形質転換を行った後、LB 培地上で 37°C で一晩培養した。培養後、T7 と SP6 プライマーを用いて、コロニーダイレクト PCR を行った。この PCR は、AmpliTaq Gold PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Inc.) DNA ポリメラーゼを用いて、添付のプロトコールに従って反応液を調製した。反応条件は、95°C で 5 分間熱変性を行った後、95°C で 15 秒の熱変性・55°C で 15 秒のアニーリング・72°C でベクターに挿入された配列断片の長さに応じた伸長反応のセットを 30 サイクル行い、その後 72°C で 7 分間伸長反応を行った。PCR 反応後、得られた PCR 産物全量を 1.5%アガロースゲルを用いて電気泳動を行い、増幅および PCR 産物のサイズを確認した。

1-2-2-5. プラスミド抽出

1-2-2-4 におけるインサートチェックにより、正しいサイズにおける増幅が確認された形質転換体から、液体 LB 培地 5 mL 中へイノキュレーションを行い、37°C で一晩振盪培養した。培養産物から FastGene Plasmid Mini Kit (Nippon Genetics Co., Tokyo, Japan) を用いてプラスミドを抽出し DMTRP 遺伝子の配列決定に用いる鋳型とした。

1-2-2-6. シーケンシング

BsDMT-2 について記述する。PRISM BigDye Cycle sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific, Inc.) と ABI310 シーケンサー (Thermo Fisher Scientific, Inc.) を用いて配列決定した。

次に BsDMT-1 に関して記述する。Big Dye Terminator 3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific, Inc.) を用いて、1-2-2-4 で精製したプラスミド DNA に対してサイクルシーケンス反応を行った。反応条件は、最初に 96°C で 1 分間熱変性を行った後、96°C で 10 秒の熱変性・50°C で 5 秒のアニーリング・60°C で 4 分のサイクルを 28 回繰り返し、最後に 60°C で 7 分間伸長反応を行った。その後精製を行い、ABI PRISM 3130X1 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific, Inc.) により塩基配列を決定した。得られた塩基配列は、Genetyx Ver.11 (Genetyx Corporation, Tokyo, Japan) を用いて解析を行った。

1-2-3. マガキからの DMT 様 cDNA の単離

1-2-3-1. RNA 抽出と cDNA 合成

取得した各組織 (図 1-6) のうち、腸管を用い TRIsure (Nippon Genetics Co.) を用いて Total RNA を抽出し、Deoxyribonuclease I、Amplification Grade (Thermo Fisher Scientific, Inc.) を用いて DNase 処理を行った。RT-PCR は SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Thermo Fisher Scientific, Inc.) を用いて、455 ng の total RNA から二本鎖 cDNA プールを合成し、PCR 用 cDNA テンプレートとして使用した。

1-2-3-2. プライマー設計

Crassostrea gigas DMT mRNA for divalent metal transporter, complete cds として登録されているマガキ DMT (AB290410.1) の配列情報 (以降 CgDMT-1)、およびこの配列をクエリーに Oysterbase (www.oysterdb.com) (現在非公開) において検索し取得した OYG_10019291 (以降 CgDMT-2) を参考にして設計した。

1-2-3-3. cDNA の単離

PCR にはとくに記載のない限り KOD-plus-DNA ポリメラーゼを使用し、反応液は添付のプロトコールに従って調製した。CgDMT-1 に関して、PCR 法により、設計したプライマー Toyst-5UTR および Toyst-841R を用いて、腸管から取得した cDNA を用いてマガキ DMT 前半部分配列の増幅を行った。反応条件は、94°C で 2 分の初期熱変性を行った後、94°C で 15 秒の熱変性・51°C で 30 秒のアニーリング・68°C で 1 分の伸長反応を 35 サイクル行い、最後の伸長を 7 分間 68°C で行った。次に、Toyst-841F および Toyst-3UTR を用いて、マガキ DMT

後半部分配列の増幅を行った。反応条件は、94℃で2分の初期熱変性を行った後、94℃で15秒の熱変性・53℃で30秒のアニーリング・68℃で1分の伸長反応を35サイクル行い、最後の伸長を7分間68℃で行った。

中間部分の配列は、681F および 1190R を用いて増幅を行った。反応条件は、94℃で2分の初期熱変性を行った後、94℃で15秒の熱変性・50℃で30秒のアニーリング・68℃で45秒の伸長反応を35サイクル行い、最後の伸長を7分間68℃で行った。得られた PCR 産物は、6.に記載する手順でサブクローニングを行い、配列決定をした。

CgDMT-2 に関して、設計したプライマープライマー-oyst-5UTR および oyst-3UTR を用いて、閉殻筋から取得した cDNA を用いてマガキ DMT 全長配列の増幅を試みた。反応条件は、94℃で2分の初期熱変性を行った後、94℃で15秒の熱変性・58℃で30秒のアニーリング・68℃で2分の伸長反応を35サイクル行い、最後の伸長を7分間68℃で行った。記載の手段でシーケンシングまで行ったが、目的の配列は得られなかった。そこで次に、oyst-5UTR, および NotIADPN1 を用い、3'-RACE PCR 法による配列増幅を、閉殻筋・鰓・腸管・唇弁・外套膜・心臓・中腸線において行った。反応条件は、94℃で2分の初期熱変性を行った後、94℃で15秒の熱変性・60℃で30秒のアニーリング・68℃で2分45秒の伸長反応を35サイクル行い、最後の伸長を7分間68℃で行った。この増幅産物を20倍に希釈した全サンプルにおいて oyst-5UTR および NotIADPN1 の組み合わせと、oyst-906F および NotIADPN2 を用いたプライマーの組み合わせにより、nested-PCR 法による配列単離を試みた。前者の反応条件は、94℃で2分の初期熱変性を行った後、94℃で15秒の熱変性・60℃で30秒のアニーリング・68℃で2分45秒の伸長反応を35サイクル行い、最後の伸長を7分間68℃で行った。後者の反応条件は、94℃で2分の初期熱変性を行った後、94℃で15秒の熱変性・70℃で30秒のアニーリング・68℃で1分45秒の伸長反応を5サイクル、94℃で15秒の熱変性・65℃で30秒のアニーリング・68℃で1分45秒の伸長反応を5サイクル、94℃で15秒の熱変性・60℃で30秒のアニーリング・68℃で1分45秒の伸長反応を25サイクル行い、最後の伸長を7分間68℃で行った。同様にシーケンシングまで行ったが、目的の配列は得られなかった。そこで次に、PCR 酵素を PrimeSTAR® Max DNA Polymerase (Takara Bio Inc.) に変更した。反応液の調整は添付のプロトコールに従った。設計したプライマープライマー-oyst-5UTR および oyst-3UTR を用いて、閉殻筋・鰓・腸管・唇弁・外套膜・心臓・中腸線から取得した cDNA を用いてマガキ DMT 全長配列の増幅を試みた。反応条件は、98℃で2分の初期熱変性を行った後、98℃で10秒の熱変性・55℃で5秒のアニーリング・72℃で2分の伸長反応を35サイクル行い、最後の伸長を7分間72℃で行った。このうち、最もバンドが強く出現した閉殻筋から得られた増幅産物を用いて同様にクローニングまで行ったが、

目的の配列は得られなかった。そこで次に、*oyst-5UTR* および *NotIADPN1* の組み合わせで閉殻筋・鰓・腸管・唇弁・外套膜・心臓・中腸線から取得した cDNA を用いて PCR を行った。反応条件は、98℃で2分の初期熱変性を行った後、98℃で10秒の熱変性・55℃で5秒のアニーリング・72℃で2分の伸長反応を35サイクル行い、最後の伸長を7分間72℃で行った。この増幅産物を20倍希釈したものをテンプレートとし、*oyst-5UTR* および *NotIADPN2* を用いて nested PCR を行った。反応条件は、98℃で2分の初期熱変性を行った後、98℃で10秒の熱変性・55℃で5秒のアニーリング・72℃で2分の伸長反応を35サイクル行い、最後の伸長を7分間72℃で行った。同様にシーケンシングまで行ったが、目的の配列は得られなかった。そこで、20倍希釈した PCR 産物をテンプレートに、①*oyst-5UTR* と *oyst-3UTR*、②*oyst-5UTR* と *oyst-906R*、③*oyst-906F* と *oyst-3UTR* の組み合わせでもう一度 nested PCR を行った。反応条件は、①のプライマーの組み合わせが、98℃で2分の初期熱変性を行った後、98℃で10秒の熱変性・55℃で5秒のアニーリング・72℃で2分の伸長反応を35サイクル行い、最後の伸長を7分間72℃で行った。②と③に関して反応条件は、98℃で2分の初期熱変性を行った後、98℃で10秒の熱変性・72℃で1分のアニーリングおよび伸長反応を30サイクル行い、最後の伸長を7分間72℃で行った。同様にクローニングまで行ったが、目的の配列は得られなかった。

ここまで使用してきた生物サンプルが本当にマガキ *Crassostrea gigas* であることを確認するため、サンプルのゲノム抽出およびミトコンドリア COI 領域のシーケンシングを行った。ゲノム抽出は、1-2-1.において同時に採取していた閉殻筋組織 20.3 mg を用いて、DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN) の「動物組織からのトータル DNA 精製 (スピнкаラム・プロトコール)」に従って行った。抽出したゲノムを用いて、日本バーコードオブライフ・イニシアティブが公開している COI 増幅用のプライマーセット LCO1490 および HCO2198 (Hebert et al., 2003-a, 2003-b; Ole Folmer et al., 1994) を用いて PCR を行った。PCR 酵素は KOD plus を用い、反応条件は、94℃で2分の初期熱変性を行った後、94℃で15秒の熱変性・50℃で30秒のアニーリング・68℃で1分の伸長反応を35サイクル行い、最後の伸長を7分間68℃で行った。同様にシーケンシングまで行い、得られた配列をクエリーに BLAST 検索を行ったところ、*Crassostrea gigas* が Query Cover 100%, E-Value 0 でヒットしたため、生物サンプルはマガキであることが確認された。

1-2-3-4. サブクローニングとインサートチェック

1-2-3-3.で得られた PCR 産物は、1%アガロースゲルを用いた電気泳動により分離し、予想される長さのバンドを切り出した。その後、Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System

(Promega) を用いて、切り出したゲルから DNA 断片を抽出・精製した。精製した DNA 断片は、TA-cloning 法により pGEM-T Easy ベクター (Promega) に組み込んだ。Competent high DH5 α (TOYOBO CO.) を用いた形質転換を行った後、LB 培地上で 37°C で一晩培養した。培養後、T7 と SP6 プライマーを用いて、コロニーダイレクト PCR を行った。この PCR は、AmpliTaq Gold PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Inc.) DNA ポリメラーゼを用いて、添付のプロトコールに従って反応液を調製した。反応条件は、95°C で 5 分間熱変性を行った後、95°C で 15 秒の熱変性・55°C で 15 秒のアニーリング・72°C でベクターに挿入された配列断片の長さに応じた伸長反応のセットを 30 サイクル行い、その後 72°C で 7 分間伸長反応を行った。PCR 反応後、得られた PCR 産物全量を 1.5% アガロースゲルを用いて電気泳動を行い、増幅および PCR 産物のサイズを確認した。

1-2-3-5. プラスミド抽出

1-2-3-4. におけるインサートチェックにより、正しいサイズにおける増幅が確認された形質転換体から、QIAquick Spin (QIAGEN) を用いてプラスミドを抽出し配列決定に用いる鋳型とした。

1-2-3-6. シーケンシング

Big Dye Terminator 3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific, Inc.) を用いて、2-3-6 で精製したプラスミド DNA に対してサイクルシーケンス反応を行った。反応条件は、最初に 96°C で 1 分間熱変性を行った後、96°C で 10 秒の熱変性・50°C で 5 秒のアニーリング・60°C で 4 分のサイクルを 28 回繰り返し、最後に 60°C で 7 分間伸長反応を行った。その後精製を行い、ABI PRISM 3130X1 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific, Inc.) により塩基配列を決定した。得られた塩基配列は、Genetyx Ver.11 (Genetyx Corporation) を用いて解析を行った。

1-2-4. 膜貫通部位予測とモチーフ検索

膜貫通部位予測には、Phobius (Käll et al., 2004) を用いた。保存されたモチーフの検索には Multiple Em for Motif Elicitation Version 5.1.1 (MEME, <http://meme-suite.org/tools/meme>) (TL Bailey, 1994) を用い、最大検出モチーフ数を 5 に設定した以外はパラメーターを初期値に設定した。

1-2-5. 分子系統解析

1-2-2 および 1-2-3 で得られた BsDMT-1, BsDMT-2, CgDMT-1, CgDMT-2 遺伝子および、各種生物の DMT-1 遺伝子配列および、DMT-1 と同じ SLC11 ファミリーに含まれる Nramp1 遺伝子を NCBI の gene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>) から取得した。得られた各種生物の DMT-1 遺伝子配列および Nramp1、DMTRP 配列は、MAFFT version 7 (Katoh et al., 2018, Katoh & Standley, 2013) を用いてアラインメントし、trimAL v1.2 (Capella-Gutiérrez et al., 2009) (<http://trimal.cgenomics.org/>) により、アラインメントが困難な領域を自動的に削除した。その後、RAxML プログラム (Stamatakis, 2006) により最尤法により系統樹を構築した。その際 1000 回のブートストラップ解析を行った。外群には、酵母および大腸菌の DMT-1 遺伝子である MNT および SMF1 を用いた。

1-2-6. 重金属曝露による遺伝子発現応答及び組織中の金属量測定

1-2-6-1. 生物試料

シチヨウシンカイヒバリガイは、1-2-2 と同様に採集されたのち、1 か月間新江ノ島水族館において飼育されていた個体を用いた。大きさは、殻長 6.9 ± 1.2 cm, 殻高 3.7 ± 0.5 cm, 殻幅 2.7 ± 0.5 cm であった。マガキは、佐藤養殖場（三重県志摩市）より購入し、水揚げ後殺菌・滅菌処理を一切せずに郵送されたものを用いた。大きさは、殻長 8.5 ± 0.5 cm, 殻高 4.7 ± 0.6 cm, 殻幅 3.2 ± 0.9 cm であった。

1-2-6-2. 重金属を含む溶液の作成

DMT 遺伝子および DMTRP 遺伝子の外環境の影響による発現応答を調べるため、重金属を含む溶液を作成した。DMT 遺伝子はシチヨウシンカイヒバリガイにおいて高発現であり、DMTRP 遺伝子は低発現であり、またマガキにおいて DMT 遺伝子が低発現、DMTRP 遺伝子が高発現であったことから、DMT 遺伝子の発現応答はシチヨウシンカイヒバリガイにおいて、DMTRP 遺伝子の発現応答はマガキにおいて測定した。曝露する金属として、ヒト DMT において輸送が確認されており (Gunshin et al., 1997)、シチヨウシンカイヒバリガイの生息する明神海丘堆積物中にある金属のうち、海水中で 2 価になり、他の背弧海盆・海嶺よりも多い金属として、銅・鉛・亜鉛 (飯笹ほか 1998) を、ヒト DMT-1 において輸送が確認されていないが明神海丘堆積物中に含まれる水銀 (丸茂ほか 2013)、一般的な熱水噴出域堆積物中に含まれる鉄・カドミウム (飯笹ほか 1998) を選択した。各溶液の濃度は、二枚貝における各金属の LD₅₀ の値 (Devi, 1996, Yap et al., 2004) および、二枚貝への重金属曝露実験を行った先行研究 (Company et al., 2010, Hardivillier et al., 2006, Muralidharan et al., 2012) に倣い、LD₅₀ の値の低い銅・水銀に関しては 50 µg/L に、それ以外に関しては 100 µg/L になる

ように調製した。

1-2-6-3. 重金属曝露

シチヨウシンカイヒバリガイおよびマガキは、無脊椎動物の飼育の際に有害となる金属イオンを除去した人工海水 MARINE ART BR (Osakayakken. Co., Osaka, Japan) 15 L 中で 24 時間の馴致の後、水銀・カドミウム・鉛・銅・鉄・亜鉛の各種金属を含む人工海水中および、ネガティブコントロールとして、何の金属も添加しない人工海水中の計 7 群に、7 日間曝露した。それぞれの群に 5 個体から 8 個体使用した。

1-2-6-4. RNA 抽出と濃度調節

7 日間の曝露終了後、シチヨウシンカイヒバリガイは閉殻筋・足糸牽引筋・足・鰓・腸管・腎臓・唇弁・外套膜・生殖腺・心臓の計 10 組織をサンプリングし、マガキは中腸線・腸管・心臓・唇弁・鰓・外套膜・閉殻筋の計 7 組織をサンプリングし、液体窒素によって急冷した後、使用まで -80°C で保存した。各組織から TRIsure を用いて RNA を抽出した。抽出後、各サンプルの濃度を 100 ng/μL となるように調製した。

1-2-6-5. DNase 処理、cDNA 合成

Deoxyribonuclease I, Amplification Grade による DNase 処理後、20 ng の total RNA を、MultiScribe™ Reverse Transcriptase (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits に付属、Thermo Fisher Scientific, Inc.) 逆転写酵素を用いて cDNA を合成した。

1-2-6-6. プライマー・TaqMan プローブの設計

リアルタイム PCR のためのプライマーおよびプローブは、シチヨウシンカイヒバリガイ DMT-2 遺伝子およびマガキ DMT-1 遺伝子特異的となるように、GenScript が提供する Bioinformatics Tools の中の、GenScript Real-Time PCR (TaqMan) Primer Design (<https://www.genscript.com/tools/real-time-pcr-taqman-primer-design-tool>) を使用し、シチヨウシンカイヒバリガイでは特異的フォワードプライマー DMT-F、リバースプライマー DMT-R およびプローブ DMT-P を設計した。同様にマガキではフォワードプライマー CdRP-F2、リバースプライマー CgRP-R2 およびプローブ CgRP-P を設計した。

1-2-6-7. 定量的リアルタイム PCR

合成した cDNA を 1.5 μL 用いて、20 μL リアルタイムの反応系でリアルタイム PCR を

行った。その際のスタンダードとして、シチヨウシンカイヒバリガイ DMT 全長 cDNA のプラスミドを、32 amol, 3.2 amol, 0.32 amol, 0.032 amol, 0.0032 amol, 0.00032 amol, 0.000032 amol となるように調製した。マガキ DMDTRP 全長 cDNA のプラスミドは、555 amol, 55.5 amol, 5.55 amol, 0.555 amol, 0.0555 amol, 0.00555 amol, 0.000555 amol となるように調製した。反応条件は、50°C で 2 分、95°C で 10 分の熱変性を行った後、95°C で 15 秒の熱変性・60°C で 1 分の伸長反応のセットを 45 サイクル行った。

リアルタイム PCR を実施する組織は以下の通りとした。シチヨウシンカイヒバリガイに関しては、まず重金属に曝露せず 7 日間馴致飼育したコントロール群の全採取組織について最初に解析を行い、最も発現量が多かった鰓をリアルタイム PCR 解析組織に選んだ。また、鰓に加えて、ヒトなど哺乳類において最も DMT が高発現となる十二指腸 (Gunshin et al., 1997) に対応する組織として腸管、ホタテガイにおける RT-PCR による DMT 組織発現特異性解析の結果、鰓、腸管に次いで高発現であった閉殻筋 (Toyohara et al., 2005)、貝殻形成を行う外套膜、足糸の作成を行う足についても解析を実施した。マガキは上記より、鰓、中腸腺、腸管において解析を実施した。

1-2-6-8. 重金属曝露組織中の金属量測定

マガキについては、誘導結合プラズマ質量分析法 (ICP-MS) を用いて鰓・腸管・中腸腺中の金属量測定を行った。各曝露区において採取した全個体の各組織を一つの試料として、70°C で 48 時間乾燥させたのち、Shimadzu Techno-Research, Inc. (Kyoto, Japan) に解析を委託した。

1-2-6-9. 統計解析

統計解析は、R スタンダードパッケージ (<https://www.r-project.org/>) を用いて ANOVA による分散分析を行い、これにより有意差が検出されたものに関して、TukeyHSD 法によるパラメトリック多重比較を行った。

1-3. 結果

1-3-1. シチヨウシンカイヒバリガイおよびマガキからの DMT 様 cDNA の単離

遺伝子探索を行った結果、シチヨウシンカイヒバリガイ・マガキからそれぞれ二つずつの、DMT 様配列の存在が確認された (図 1-7, 1-8、表 1-2)。これら配列の相同性は、シチヨウシンカイヒバリガイ BsDMT-1 と BsDMT-2 において 51.40%、マガキ CgDMT-1 と CgDMT-2 において 52.88%であった。ただし、マガキ CgDMT-2 は、ゲノムデータベース上においては配

列が確認されたものの、cRNA 合成酵素の変更や、シャトル PCR やタッチダウン PCR といった複数の PCR 法および PCR 酵素の変更など、様々な方法を試みたにもかかわらず実際に cDNA を単離するには至らなかった。

1-3-2. 膜貫通部位予想とモチーフ検索

膜貫通部位は BsDMT-1, BsDMT-2, CgDMT-1 および CgDMT-2 において 12 回箇所推定され、それぞれの N および C 末端は共に細胞内に突出していると推定された (図 1-9~112)。モチーフは、BsDMT-1, BsDMT-2, CgDMT-1 および CgDMT-2 において同じモチーフが同じ順序で検出された (図 1-13)。

1-3-3. 分子系統解析

得られた分子系統樹では、BsDMT-1 と CgDMT-1, BsDMT-2 と CgDMT-2 がそれぞれ異なるクレードに属することがわかった (図 1-14)。

BsDMT-1、CgDMT-1 およびその相同分子と考えられるカサガイ (*Lottia*) DMT-1 の属するクレードは、既知の各種生物の DMT が属するクレードと独立していた。

1-3-4. 重金属曝露による遺伝子発現応答及び組織中の金属量測定

曝露実験による各個体の生残率を表 1-3 に示す。マガキはどの実験区においても全個体生残したが、シチヨウシンカイヒバリガイはカドミウム・鉛曝露区において生残率が 71%と最低で、一方銅曝露区においては生残率が 100%であった。

マガキについては ICP-MS による曝露金属の定量を行った。組織をプールして分析を行ったため、統計的有意差は確認できないが、鰓、腸管、中腸腺、いずれにおいても、水銀は曝露区で顕著に含有量が高くなった (図 1-22~1-24)。鰓では、鉛量も増加していた。一方、いずれの組織においても、銅・亜鉛・鉄の組織内金属量は曝露区のほうが低い傾向にあった。

定量的リアルタイム PCR による mRNA 量の解析は、まずシチヨウシンカイヒバリガイ BsDMT-2 に関して、重金属に曝露せず 7 日間飼育したコントロール群の各組織について最初に解析を行った (図 1-15)。TukeyHSD ($P<0.05$) により有意差検定を行うと、いくつかの組織間で有意差が認められた (表 1-4)。次に、各種金属に曝露後の、鰓 (図 1-14)、腸管 (図 1-15)、閉殻筋 (図 1-16)、外套膜 (図 1-17) および足 (図 1-18) における mRNA 量を定量した結果は、いずれの組織においても、コントロールと金属曝露群の間に有意差は見られなかった。ただし、腸管においてカドミウム曝露群と亜鉛曝露群の間で、また、足において亜鉛曝露群とカドミウム・水銀・鉄曝露群との間でそれぞれ有意差が認められた。

マガキ CgDMT-1 に関して、リアルタイム PCR の結果もシチヨウシンカイヒバリガイと同様に、いずれの組織においても、コントロールと金属曝露群の間に有意差は見られなかった（図 1-16~1-21）が、鰓において、水銀曝露によって発現量が増加する傾向がみられた。腸管では、銅曝露時に CgDMT-1 遺伝子の発現量が増加傾向にあった（図 1-20）。中腸腺においては、全ての重金属曝露区間において CgDMT-1 遺伝子の発現量が減少傾向にあった（図 1-21）。

1-4. 考察

シチヨウシンカイヒバリガイにおいては参照できるデータベースがなかったため、BsDMT-1, 2 共に部分配列を RACE 法等を用いて少しずつ伸ばして全長配列を取得したが、とくに BsDMT-1 に関しては非常に多くの工程を経る必要があった。また、部分配列取得時にも多くのバリエーションが検出された。これらのことから、発現量がとても低い・もしくは複雑な立体構造をとっていることが予測された。マガキ CgDMT-2 は、ゲノムデータベース上においては配列が確認されたものの、様々な工夫にもかかわらず、実際に cDNA を単離するには至らなかった。このことから、発現量が極端に低い可能性が考えられた。

BsDMT-1, BsDMT-2, CgDMT-1 および CgDMT-2 において確認された配列（図 1-7, 1-8 および表 1-2）・膜貫通部位の数と位置（図 1-7~1-12）・intron の位置・consensus transport motif の配置・機能に重要なアミノ酸残基の共通性の高さは、両タンパク質が同じ輸送体ファミリーに属し、似た機能を持つことを示唆している。しかし、マガキにおいて CgDMT-1 と CgDMT-2 が別の染色体上に位置していたことから、両者は独立したタンパク質であることが示唆された。

得られた分子系統樹（図 1-14）では、BsDMT-1 と CgDMT-1 および BsDMT-2 と CgDMT-2 がそれぞれ異なるクレードに属することがわかった。BsDMT-2 および CgDMT-2 は各種動物の既知の DMT と共通のクレードを形成したが、BsDMT-1 および CgDMT-1 の属するクレードは独立していたことから、DMT-1 遺伝子と DMT-2 遺伝子の分化は古いことが示唆された。両者の起源については、第三章でより詳しく解析する。

重金属曝露における遺伝子発現応答に関して、まずシチヨウシンカイヒバリガイでは、重金属曝露を 7 日間行った。各重金属群における生残個体数は表 1-2 のようになった。とくに極端な死亡率を示す金属種はなく、銅投与群がすべて生存した以外は、どの区においても 1, 2 個体の死亡が認められた。コントロール群でも死亡個体が出現したことから、採取後 1 か月近く経過していることもあり、給餌も行っていないことから、死亡の原因は、金属の曝露ではなく個体の疲弊である可能性が考えられた。このことは、イガイにお

いてカドミウム、鉛、亜鉛よりも LD₅₀ 値が低いことが示されている銅で死亡個体がないことから支持される。

マガキにおいては、投与した金属の組織への蓄積を ICP-MS により測定した。その結果、どの組織においてもカドミウムと水銀は投与区において増加し、鰓における鉛の増加傾向を除けば、その他の金属は投与によりむしろ減少傾向にあることがわかった。このことは、銅・亜鉛・鉄などの生体にとって重要なイオンについては、環境中の濃度が上がった後も組織中の量を一定範囲に維持する機能が各組織に備わっていることを示唆する。コントロールよりも減少していたのは、外環境中に存在する過剰な金属を取り込まないように、取込みに関する機能が抑えられたことにより、組織中の金属濃度が低下した可能性が考えられた。

リアルタイム PCR の結果、どの組織もコントロールと重金属曝露時の BsDMT-1、CgDMT-2 両遺伝子の発現量に有意差は見られなかった。すなわち、今回検討した金属種は、DMT 遺伝子の発現を大きく変化させることはなかった。しかし、腸管においてカドミウムと亜鉛に、足においてカドミウム曝露区と亜鉛曝露区・水銀と亜鉛・鉄と亜鉛の間に有意差がみられた。全般的にカドミウム曝露により発現量は下がる傾向にあり（鰓を除く）、亜鉛曝露時には全般的に発現が上昇する傾向がみられた。このことから、重金属曝露により環境中の金属濃度が上昇しても、少なくとも DMT-1、DMT-2 とともに転写による応答はないということが明らかとなった。

次に、組織の金属量と遺伝子発現量に相関があるかどうかを考察した。マガキ鰓において、水銀曝露時に最も CgDMT-1 遺伝子発現量が多い傾向にあった。水銀曝露によって組織内水銀量は増加しており、従って CgDMT-1 と組織内水銀量は、正の相関がある可能性が示唆された。腸管においても、同様の傾向が認められた。一方、分析した何れの組織においても、組織内カドミウム量はカドミウム曝露によって増大しているが、遺伝子発現量は変化していなかった。腸管では銅への曝露により遺伝子発現量が増加傾向にあったが、組織内銅量は減少していた。中腸腺においては、どの金属を曝露した場合も遺伝子の発現が低下する傾向にあったが、組織内ではカドミウム・水銀の量が増加した。以上より、本研究では、マガキにおける金属の取り込み量と CgDMT-1 の mRNA レベルの間に明確な関係は認められなかった。

マガキ CgDMT-2、シチヨウシンカイヒバリガイ BsDMT-1 とともに、リアルタイム PCR の結果、どの組織もコントロールと重金属曝露時の DMT の発現量に有意差は見られなかった。したがって、金属による発現誘導についても明確な傾向を見出すことはできなかった。

以上のように、シチヨウシンカイヒバリガイ、マガキにおいて、DMT-1, 2 が組織内金属蓄積量に関して果たしている役割に関し、明確な結論は得られなかった。しかし、分子系統解析の結果は BsDMT-2 および CgDMT-2 は哺乳類の DMT など既知の DMT と同一クレードに属し、金属制御に何らかの機能を持つ可能性は残されている。また、膜貫通領域やドメイン構造がよく保存されている BsDMT-1 および CgDMT-1 についても、DMT に関連した何らかのタンパク質であると考えられ、以降の章において生物におけるその分布およびその機能の解析をさらに進めることにした。

ただし、マガキにおいて DMT-2 の cDNA の単離に至らなかったこと、シチヨウシンカイヒバリガイにおいても全長配列を一組のプライマーで単離することができず、部分配列の合成をしなければならなかったという点から、貝において DMT 様配列は発現量が少なく、スプライシングや立体構造が複雑である可能性が考えられた。そこで次章以降では、精密なゲノム配列が発表され、RNA-seq データもアクセス可能であるオニヒトデを対象として研究を開始した。



図 1-1. シチヨウシンカイヒバリガイ *Bathymodiolus septemdierum*

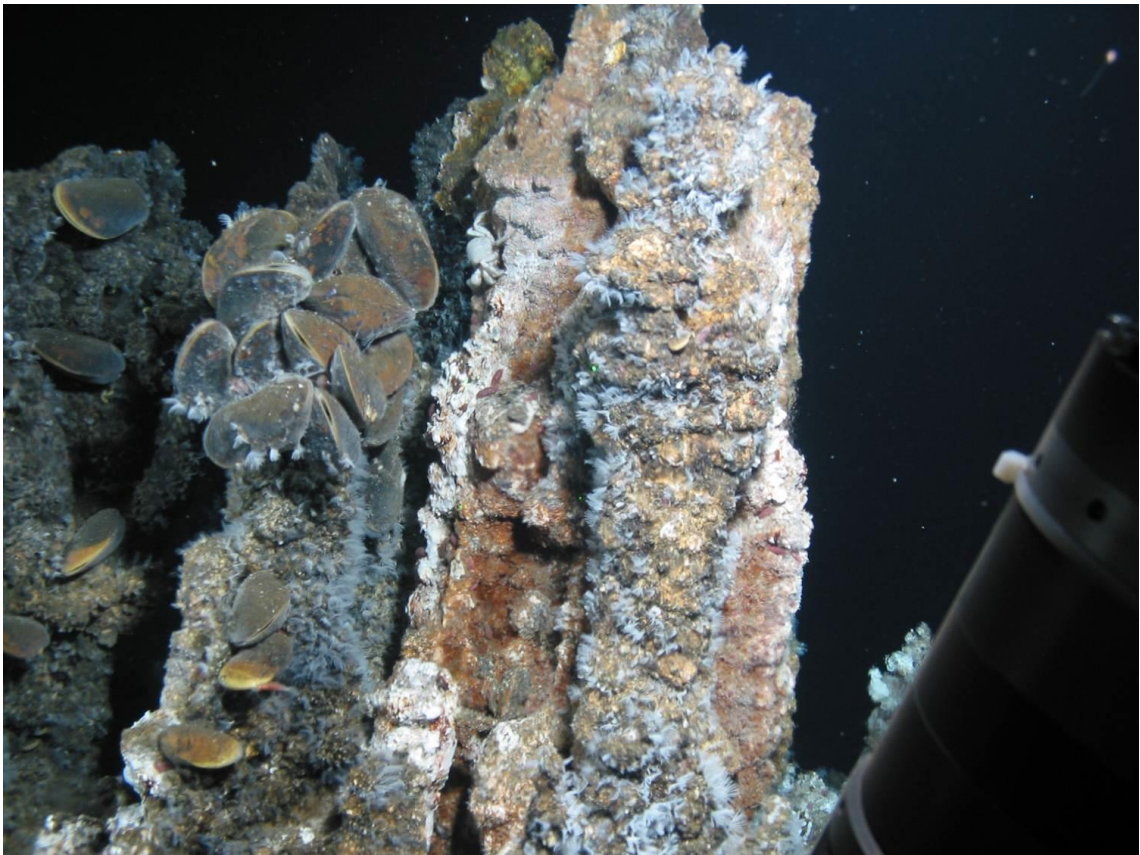


図 1-2. 自然環境中のシチヨウシンカイヒバリガイ。伊豆小笠原海域の明神海丘カルデラ内の熱水噴出域において撮影された。



図 1-3. マガキ *Crassostrea gigas*

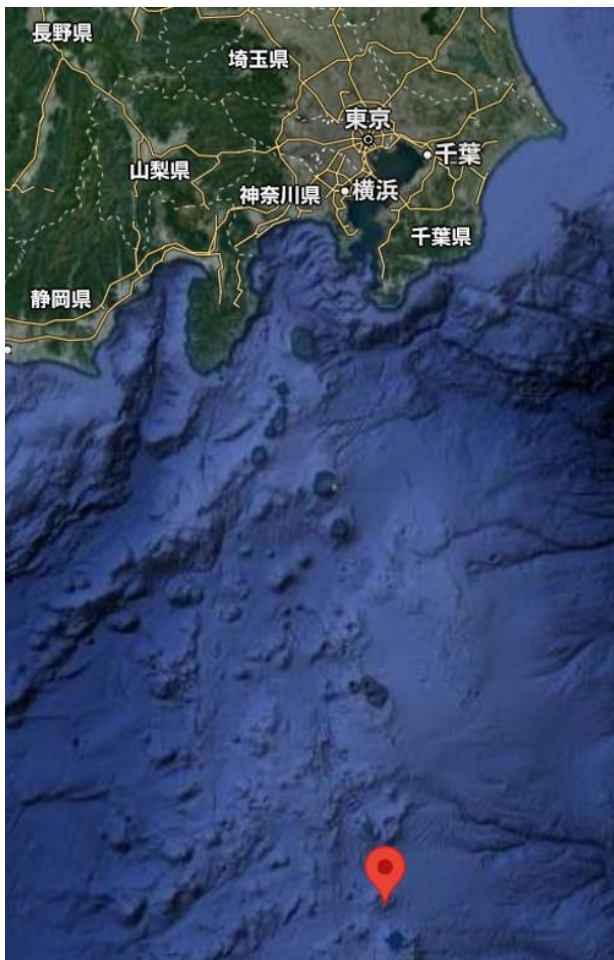


図 1-4. シチヨウシンカイヒバリガイ採取ポイントである明神海丘の位置。

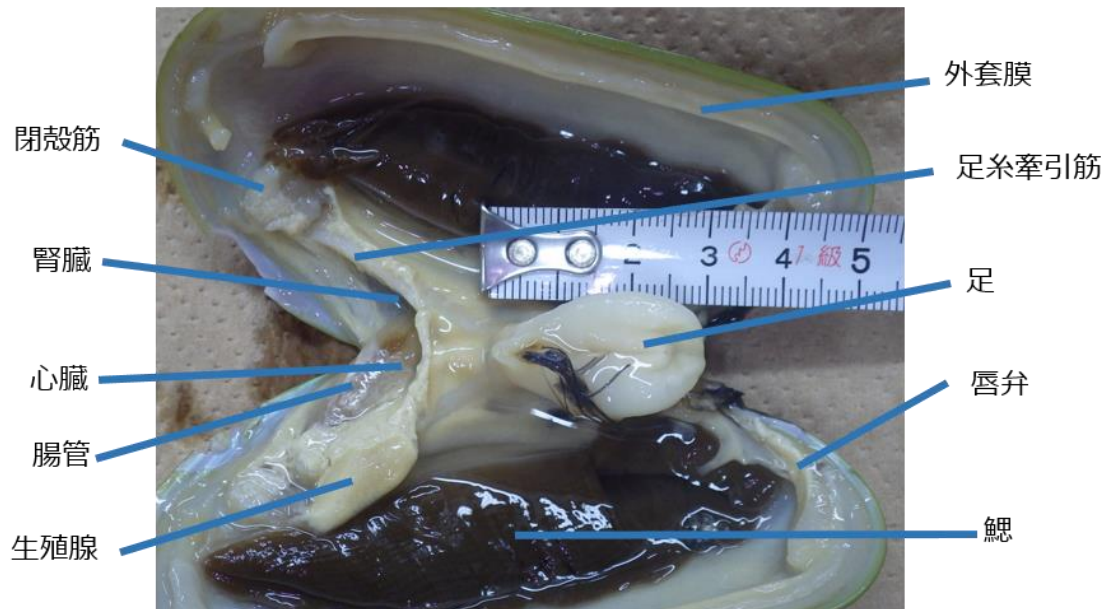


図 1-5. シチヨウシンカイヒバリガイの組織

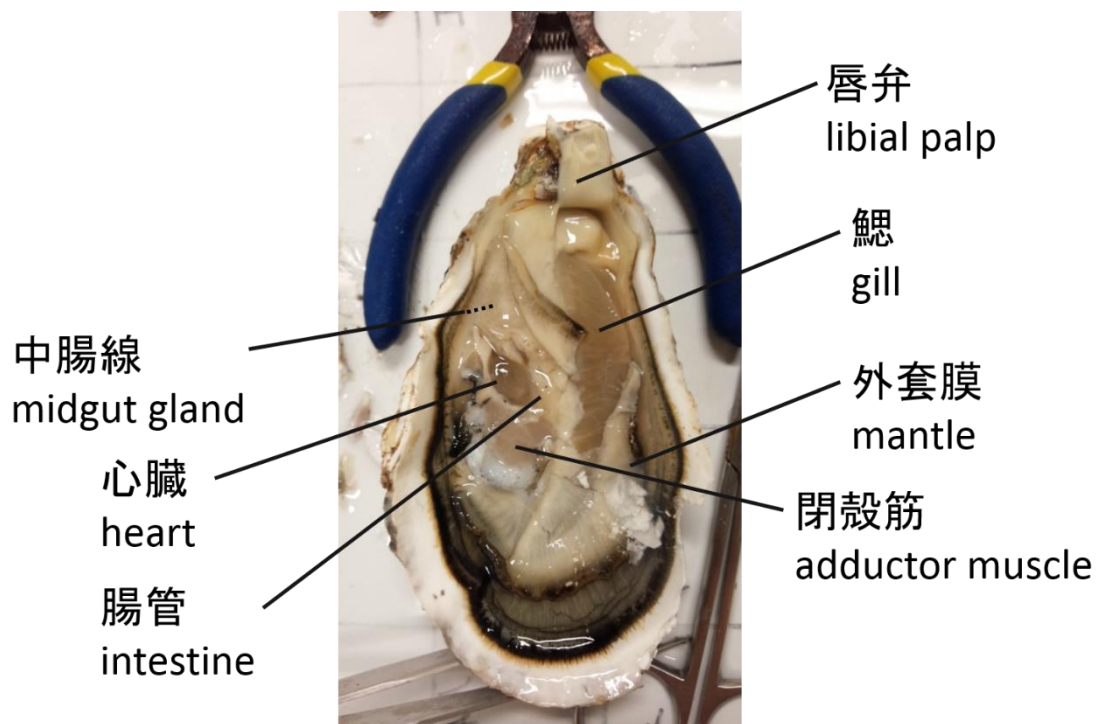


図 1-6. マガキの組織


```

BsDMT1      MRLLFFCYCFEITMTTSEECSPLEQPVNNYLSVLVQGTDNQIVD---EKRGFETIP---
BsDMT2      -----MAEQLDGIGKEIVDSPNEEVSKEKTPRLT
              ::  ::*  .:  ***      *:  .  *  **

BsDMT1      -----GQVKVPKTHNTSFSFRKLWAFTGPGFLMSIAYLDPGNIESDLQAGAIAKYKL
BsDMT2      SVASTYFDQKISIPEDPQKFFSFRKLWAFTGPGFLMSIAYLDPGNIESDLQAGSVAKFRL
              ::.:*:  .  *****:***:*

BsDMT1      IWVLMWSTVLGLILQLLAARLGCVTGMNLAQICHLEYPLVPRVVLWFMVEIAIVGSDIQE
BsDMT2      LWVLSATFLGLLMQRLAARLGVVTGMHLAEICYKHYSKVPRIILWIMIEIAIIGSDMQE
              :****  :*.***:*  *****  ***:***:*  .*.  ***:***:*:****:***:*

BsDMT1      VIGSAIALNLLSNHKIPIWAGVLITGVDTFTFLFLENAGLRKLEAFFGALIASMAATFFY
BsDMT2      VIGTAIAFYLLSDGKIPLYAGVLITITDTFTFLFDKFGLRKLEFFFTFLIMVMAGTFGY
              ***:***:  ***:  ***:*****  .*****:  *****  **  **  **,**

BsDMT1      IYVTIKPNQGDIIGMWFPCQDCDKDAVIQLVGIVGAVIMPHNIYLHSALVLTRNIDRK
BsDMT2      EYIVVHPDQPSVLKGLFVPGCEGCGPKQFLQAVGIIGAIIMPHNIYLHSALVKSRNVDR
              *:..:***  .:*  *:..*  *:..  .  .:*  ***:***:*****  :***:*.

BsDMT1      DKHEVAEAIKYNSIESAIALFVSFLINLFLVAVFAAEFSDPAHREL-----
BsDMT2      KKEEVKEANKYFFIEATLALIVSLIINIFVTSIFAEGFYGKTASQIHDKCVAEGNPHADL
              .*.**  **  **  ***:***:***:***:***  :***  *  .  :  ::

BsDMT1      -----ASLHNAGIWLSEKYGLGVKIIWIGIGILSAGQSSTMTGTYAGQFVMEGFNMNIK
BsDMT2      FNNVTDLSVDIYRGGVFLGCGFQGIAAMYIWAVGILAAGQSSTMTGTYTGQFVMEGFLNLK
              ..:..*.***:  .:***:  **.*:***:*****:*****:***:

BsDMT1      WAKWKRVLLTRSIAMVPTIILALL-ATNDLDMNWNVLQSVQLPFALLPILHFTSSET
BsDMT2      WKRWRQRVLLTRTIAIAPTILISIFEGIGQLSGMNDLLNVLSLQLPFALIPILAFTSSPH
              *  :*:*****:***:***:***:  .  .:*.  **  ***  *:*****:***  ***

BsDMT1      IMREFKNGRIMKITVWSLAVLIMGINFYLVIIFVGS-GDKWWIYPIVVLIIVVYLSYVAY
BsDMT2      IMGDFKNGIVMKIIAGILTAVVIGINMYFVVYIQELPNHWAIYLAIIVLLLFYIFLLY
              **  :****  :***  .  *:..:***:***:***:  .  :*:  **  :.....*:  :  *

BsDMT1      LAIGPHMVLRLKVSQNSLKIPKALSESVNRRTE
BsDMT2      LVW--HCLVTMEIQIFSRIPVSRFLYFMI--LI
              *.  *  ::  :..  .  :  :  *  :

```

図 1-7. シチヨウシンカイヒバリガイから単離した DMT-1 と DMT-2 をアラインメントした図。*は同一なアミノ酸を、:と. は半保存的置換がされているアミノ酸を示し、赤字は膜貫通部位を示す。

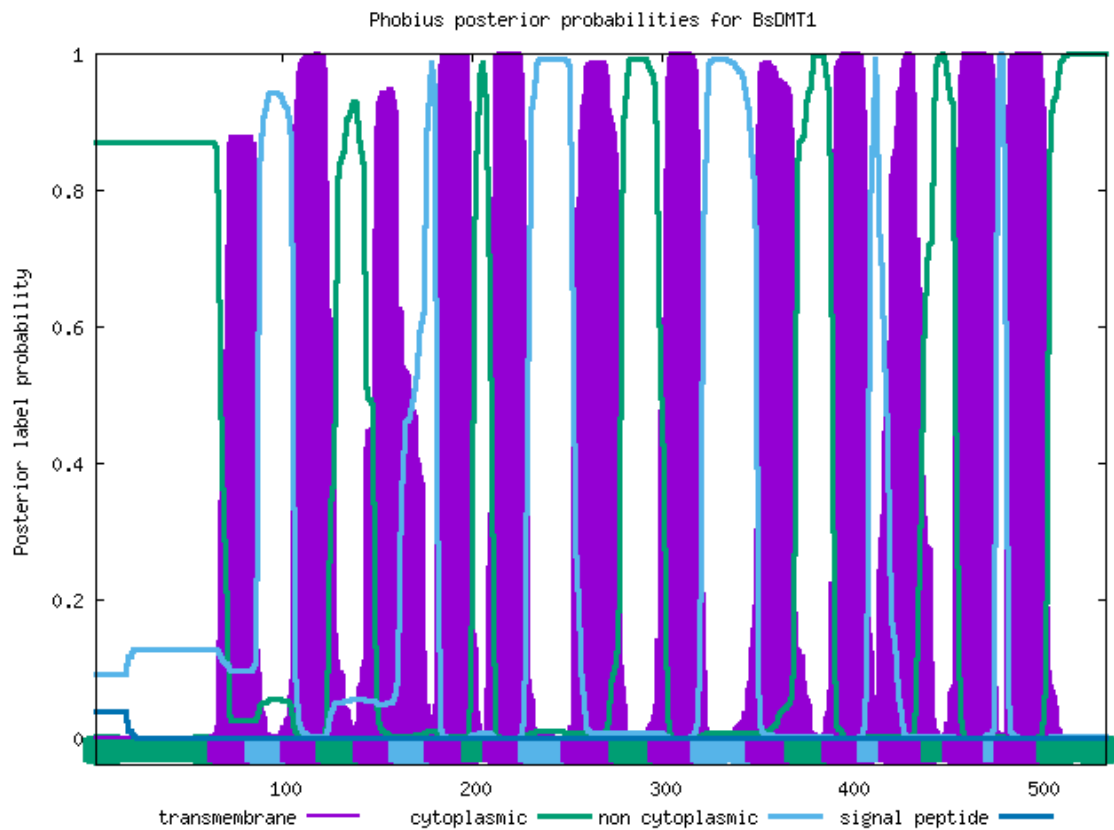


図 1-9. Phobius による BsDMT-1 膜貫通部位予測。紫色が膜貫通部位、緑が細胞内領域、青が細胞外領域。

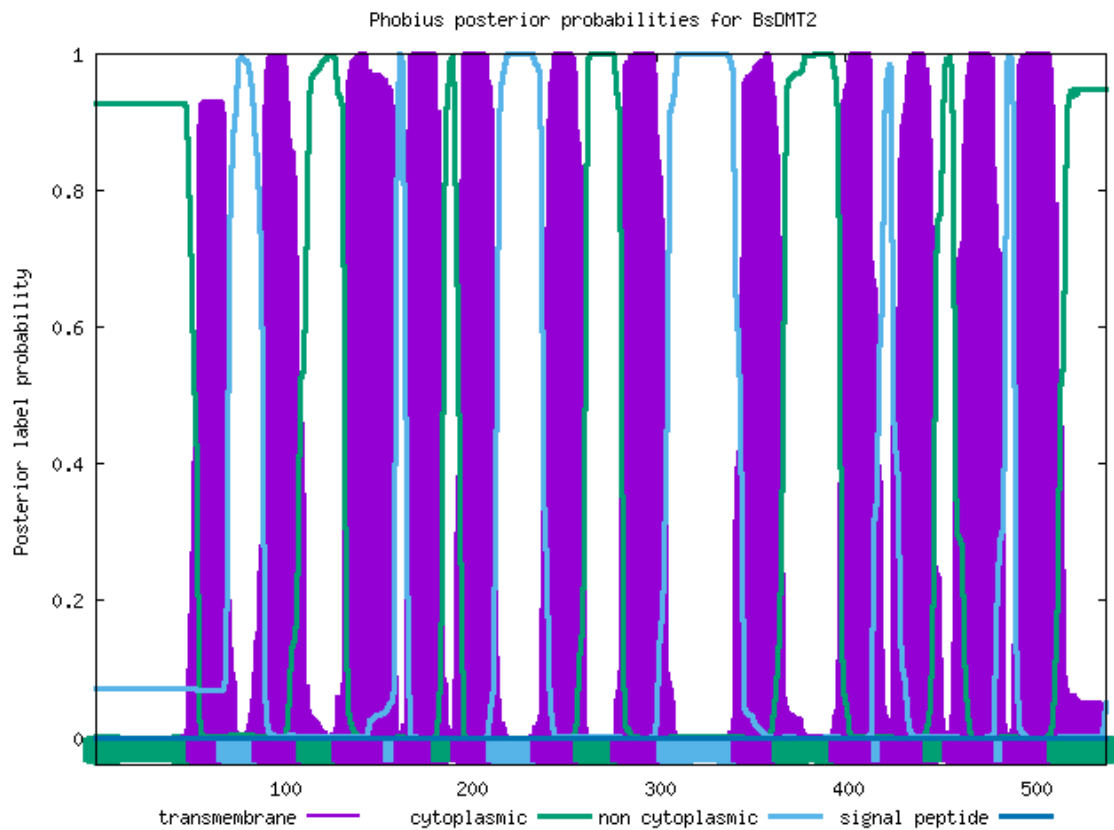


図 1-10. Phobius による BsDMT-2 膜貫通部位予測。紫色が膜貫通部位、緑が細胞内領域、青が細胞外領域。

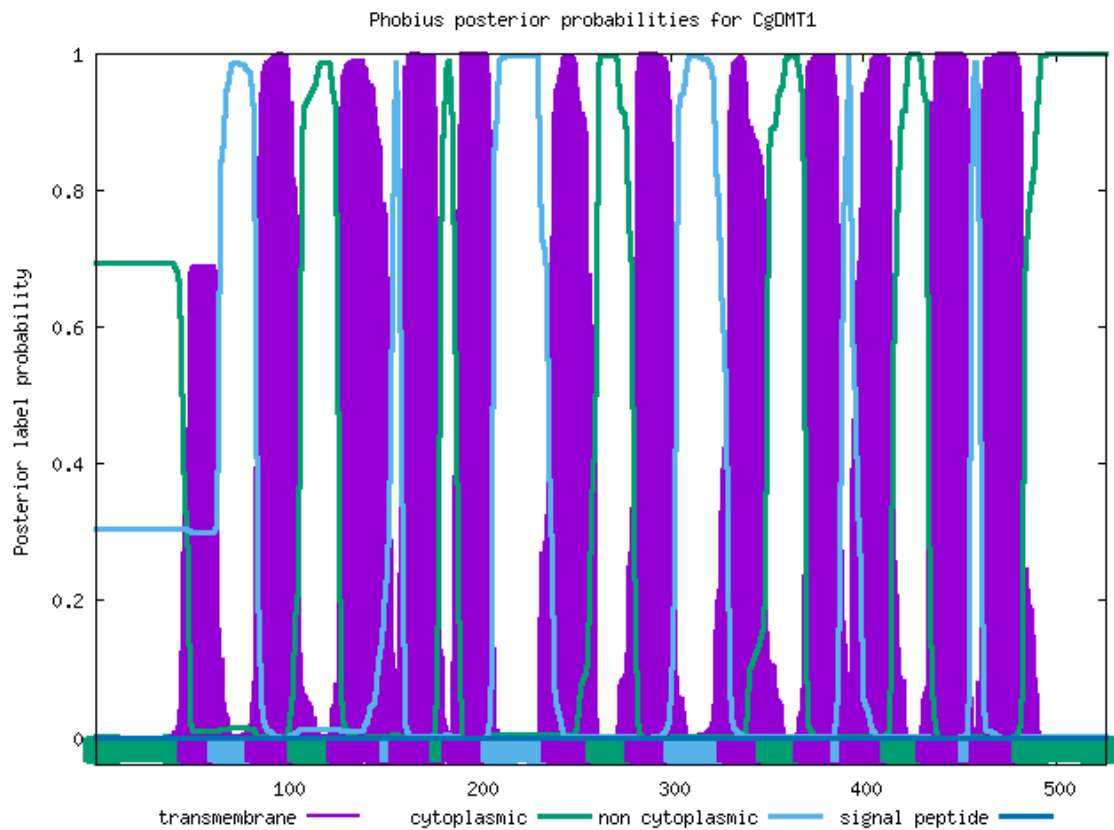


図 1-11. Phobius による CgDMT-1 膜貫通部位予測。紫色が膜貫通部位、緑が細胞内領域、青が細胞外領域。

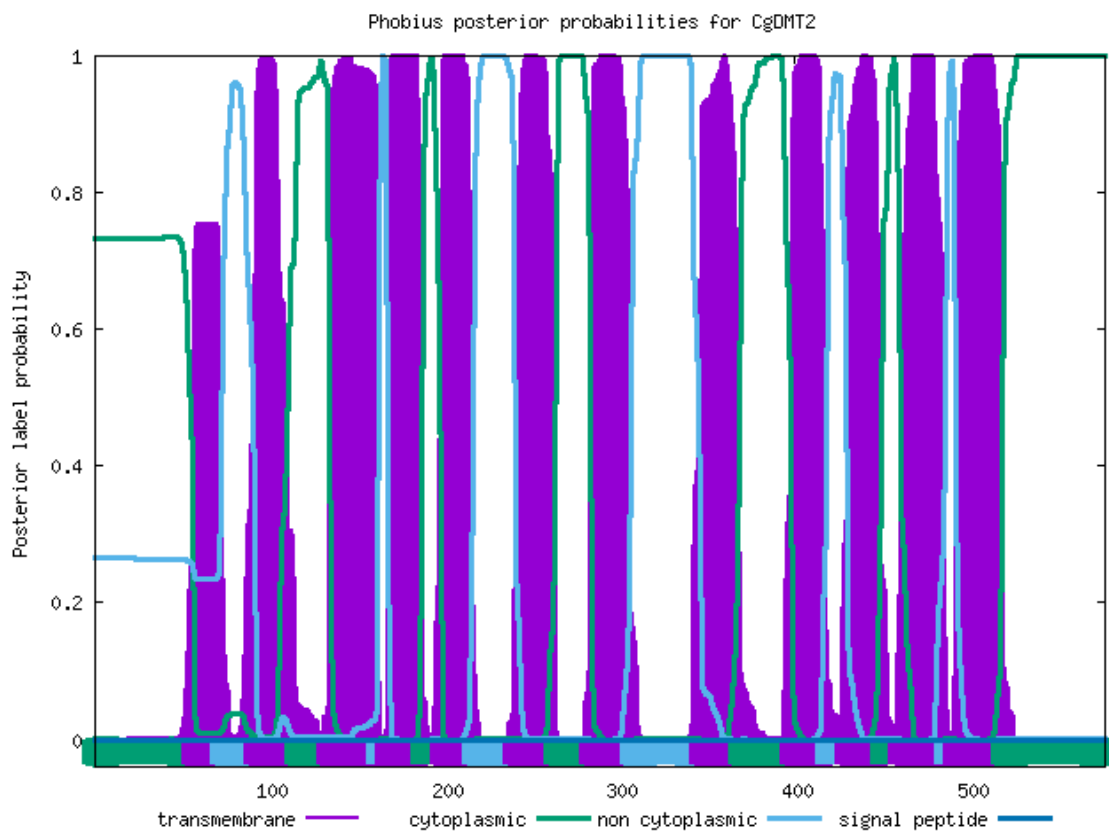


図 1-12. Phobius による CgDMT-2 膜貫通部位予測。紫色が膜貫通部位、緑が細胞内領域、青が細胞外領域。

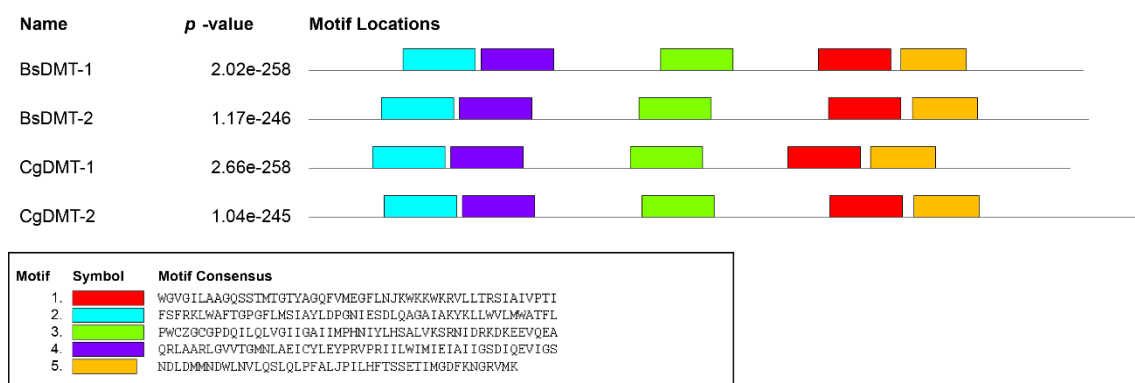


図 1-13. Multiple Em for Motif Elicitation Version 5.1.1 (MEME) によるモチーフ検索の結果。同じ色のボックスが同じモチーフを示す。黒線はアミノ酸配列の全長を示す。

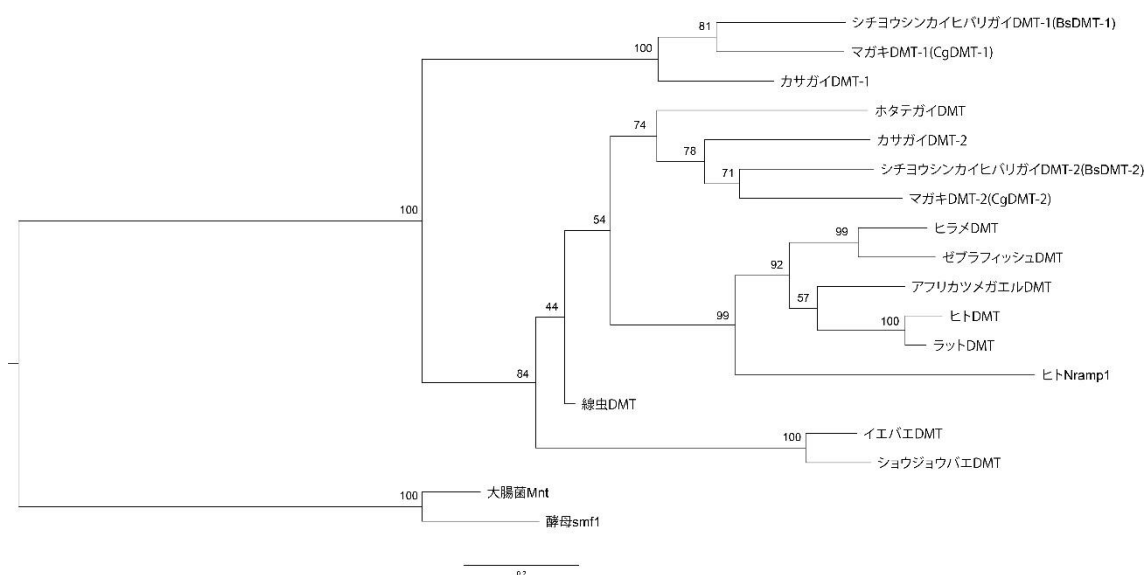


図 1-14. 最尤法で作成した BsDMT-1, 2, CgDMT-1, 2 を含む各種生物の分子系統解析。スケールバーは1 座位あたり 0.2 置換の系統的距離を示す。

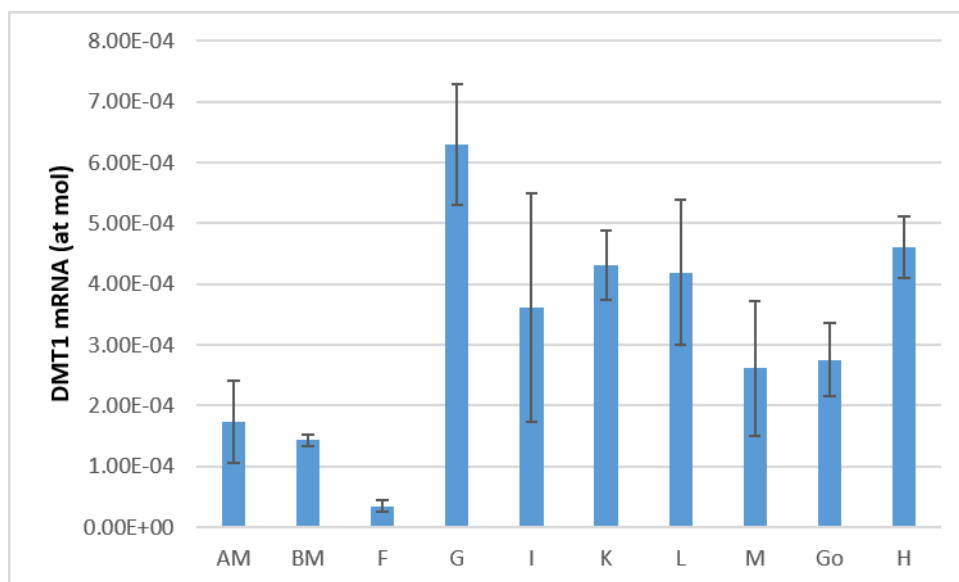


図 1-15. シチヨウシンカイヒバリガイコントロール全組織における BsDMT-1 のリアルタイム PCR の結果。n=3-4。AM が閉殻筋、BM が足糸牽引筋、F が足、G が鰓、I が腸管、K が腎臓、L が唇弁、M が外套膜、Go が生殖腺、H が心臓を示す。平均値±標準誤差で示す。

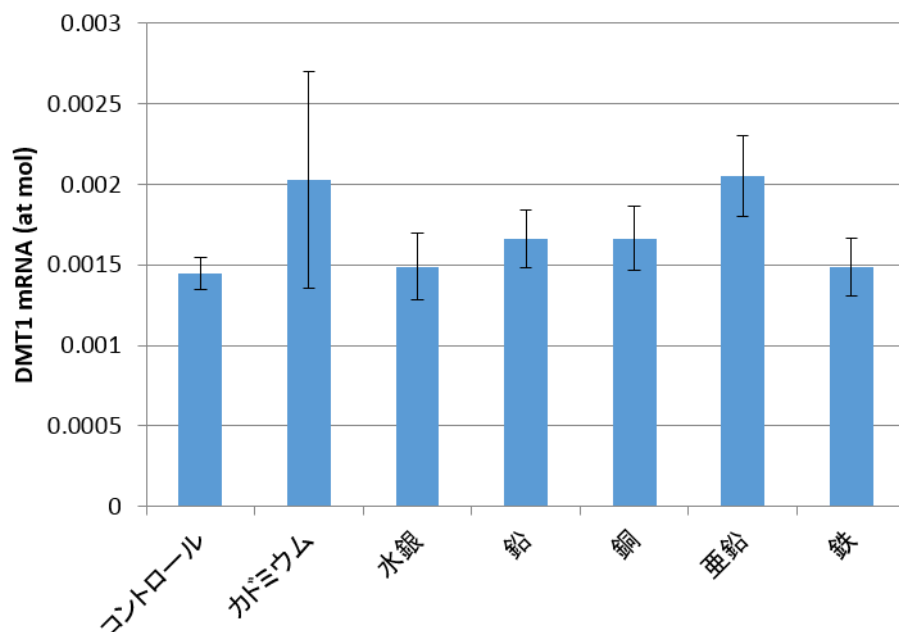


図 1-14. 各種金属に曝露後のシチヨウシンカイヒバリガイ BsDMT-1 の鰓のリアルタイム PCR の結果。平均値±標準誤差で示す。n=3-7。ANOVA では各群間に有意差は認められない (* $p<0.05$)。

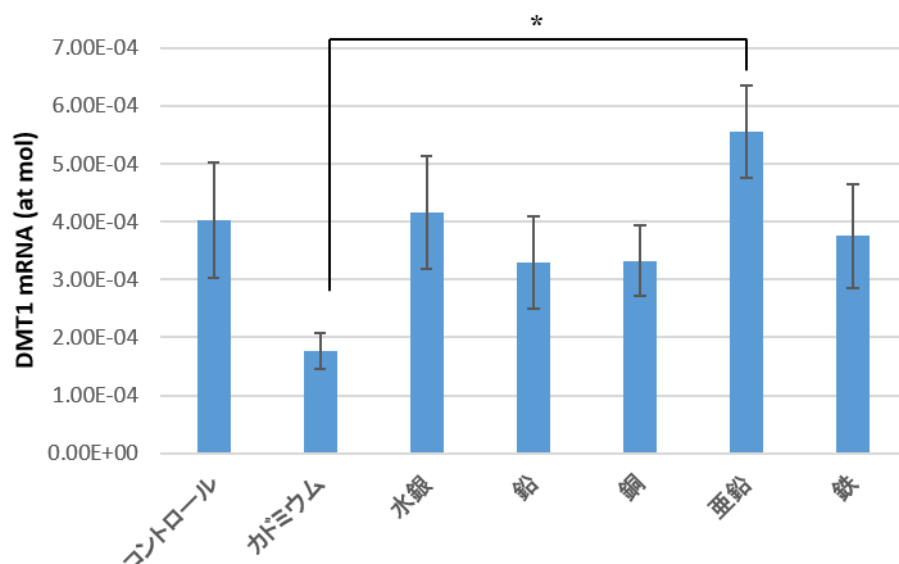


図 1-15. 各種金属に曝露後のシチヨウシンカイヒバリガイ BsDMT-1 の腸管のリアルタイム PCR の結果。平均値±標準誤差で示す。n=3-7。平均値±標準誤差で示す。カドミウム曝露群と亜鉛曝露群間の差は ANOVA および TukeyHSD により有意 (* $p<0.05$)。

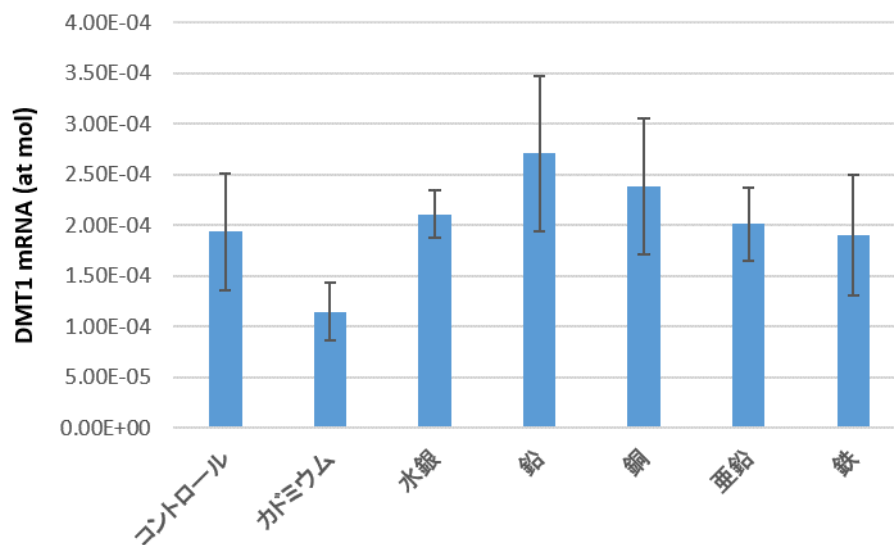


図 1-16. 各種金属に曝露後のシチヨウシンカイヒバリガイ BsDMT-1 の閉殻筋のリアルタイム PCR の結果。平均値±標準誤差で示す。n=3-7。ANOVA では各群間に有意差は認められない (* $p<0.05$)。

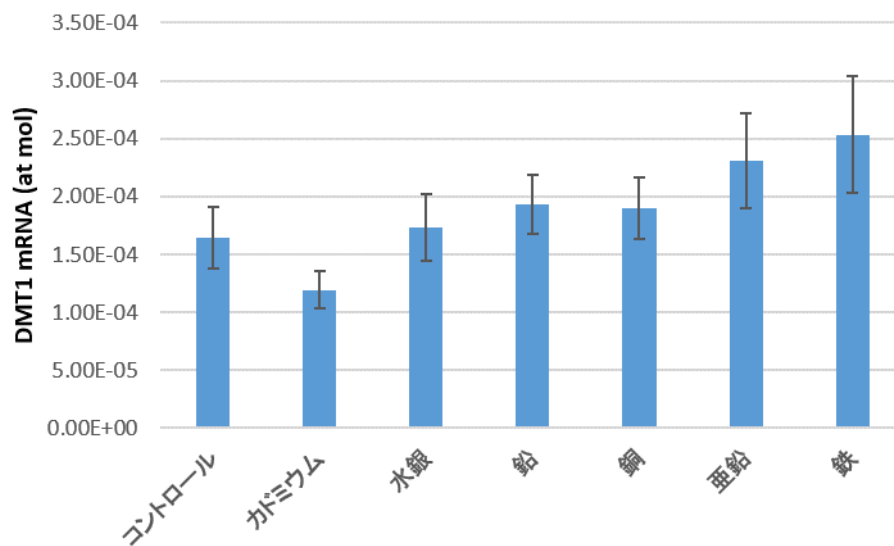


図 1-17. 各種金属に曝露後のシチヨウシンカイヒバリガイ BsDMT-1 の外套膜のリアルタイム PCR の結果。平均値±標準誤差で示す。n=3-7。ANOVA では各群間に有意差は認められない (* $p<0.05$)。

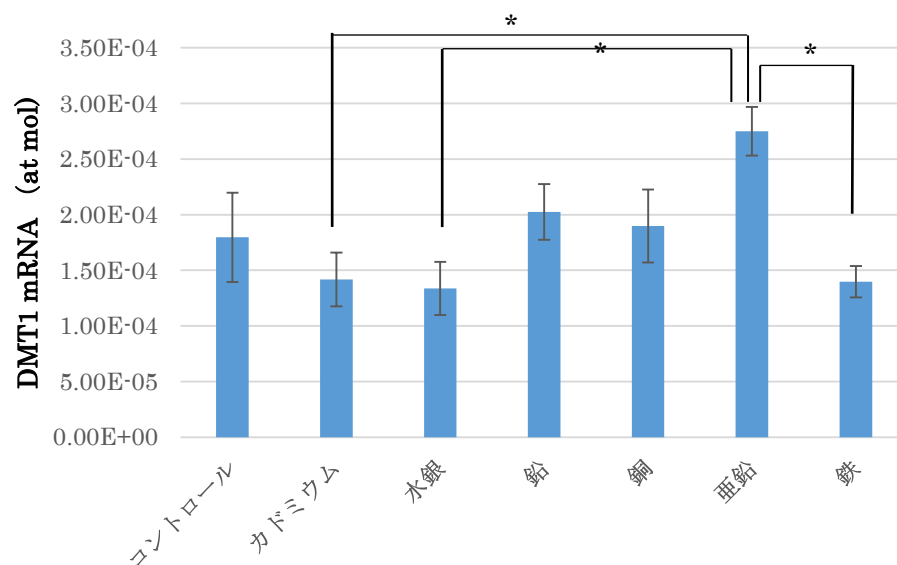


図 1-18. 各種金属に曝露後のシチヨウシンカイヒバリガイ BsDMT-1 の足のリアルタイム PCR の結果。平均値±標準誤差で示す。n=3-7。平均値±標準誤差で示す。カドミウム曝露群と水銀・亜鉛・鉄曝露群間の差は ANOVA および TukeyHSD により有意 ($P<0.05$)。

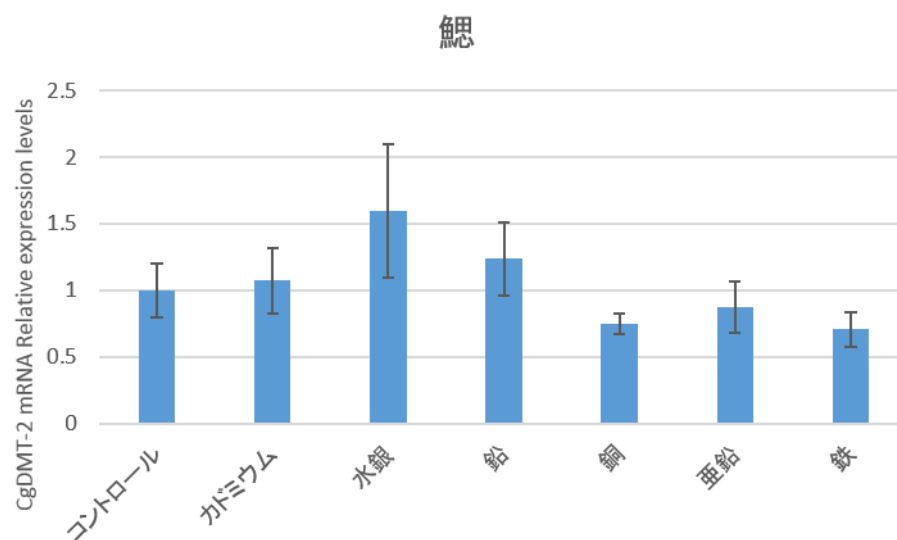


図 1-19. 各種金属に曝露後のマガキ CgDMT-2 の鰓のリアルタイム PCR の結果。平均値±標準誤差で示す。n=7。ANOVA では各群間に有意差は認められない ($*p<0.05$)。

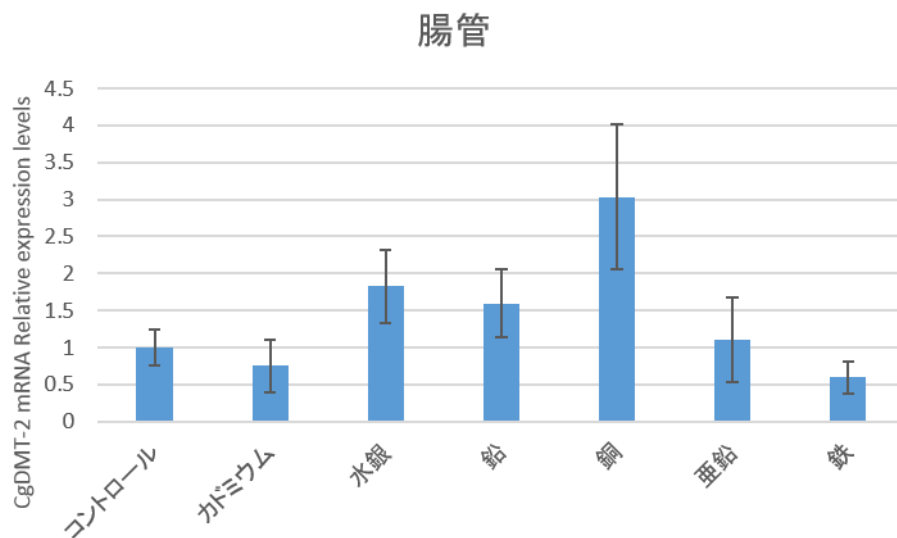


図 1-20. 各種金属に曝露後のマガキ CgDMT-2 の腸管のリアルタイム PCR の結果。平均値 ± 標準誤差で示す。n=7。ANOVA では各群間に有意差は認められない (* $p<0.05$)。

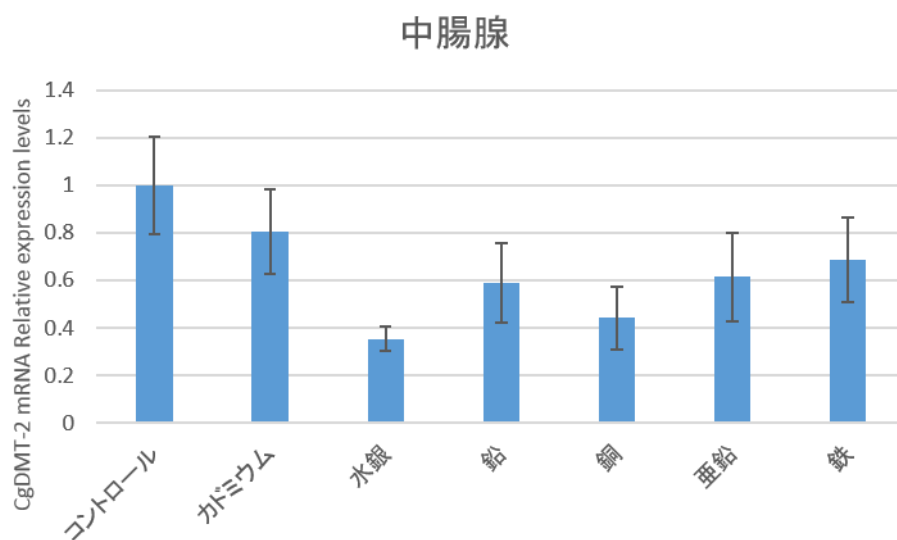


図 1-21. 各種金属に曝露後のマガキ CgDMT-2 の中腸腺のリアルタイム PCR の結果。平均値 ± 標準誤差で示す。n=7。ANOVA では各群間に有意差は認められない (* $p<0.05$)。

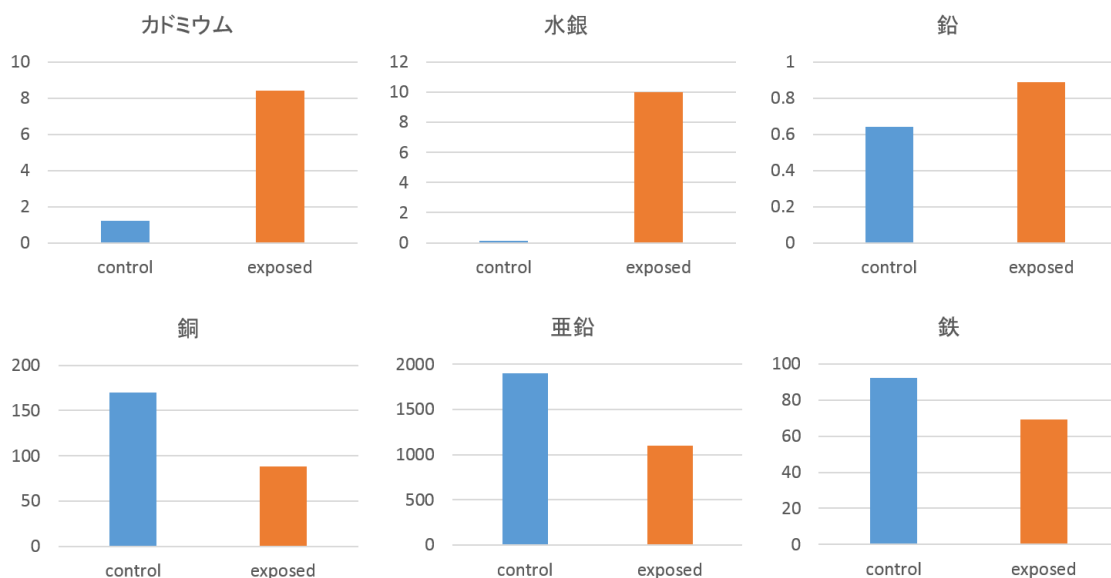


図 1-22. 各種金属に曝露後のマガキ鰓組織中の金属量の ICP-MS による定量結果。単位は mg/kg で示し、青がコントロール群、オレンジが曝露群。

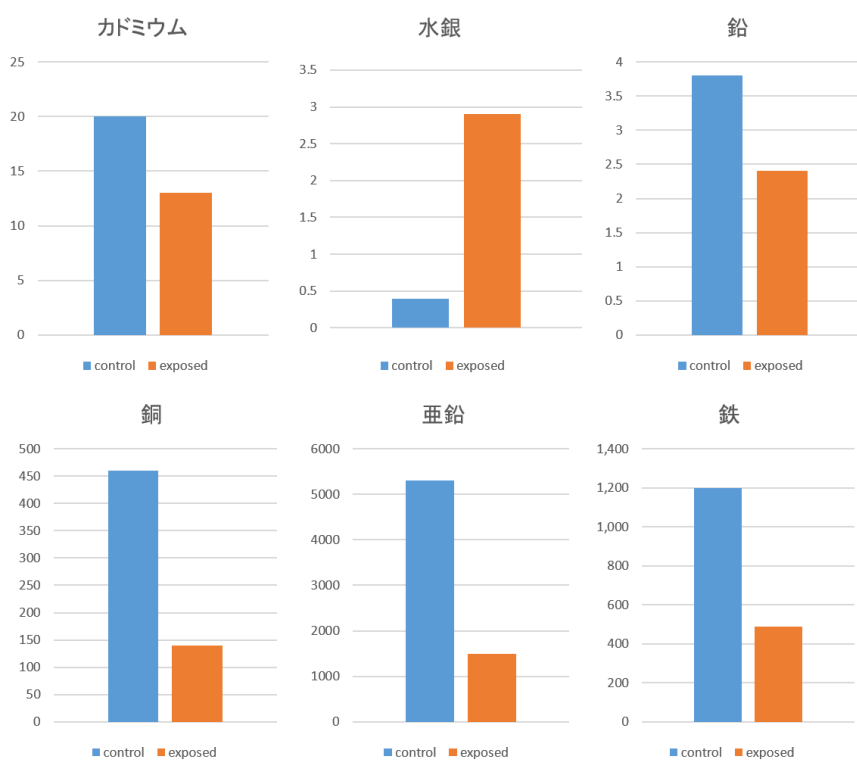


図 1-23. 各種金属に曝露後のマガキ腸管組織中の金属量の ICP-MS による定量結果。単位は mg/kg で示し、青がコントロール群、オレンジが曝露群。

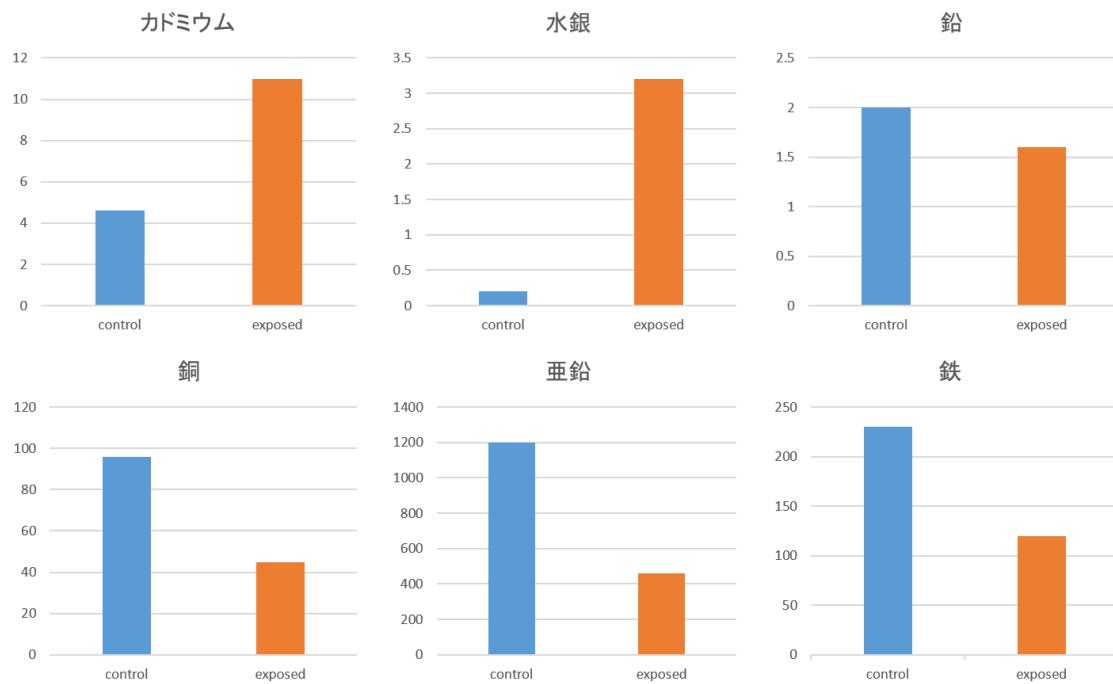


図 1-24. 各種金属に曝露後のマガキ中腸線組織中の金属量の ICP-MS による定量結果。単位は mg/kg で示し、青がコントロール群、オレンジが曝露群。

表 1-1. 本章で使用したプライマー一覧

登場章	プライマー名	配列
1-2-2-2.	tDMT-Mg-F	CAAGGAGACATTCTGATCGGAATGTGG
1-2-2-2.	tDMT-Mg-R	GTGGAGATATATATTGTGTGGCAT
1-2-2-2.	tDMT-Bs-F	CAAGGAGACATTCTGATCGGAATGTGGTTCC
1-2-2-2.	tDMT-Bs-R	TGTGGAGATTATATTGTGTGGCATAATAAAGTCTC
1-2-2-3.	pearl-DMT-F1	TTTCAGYTTTMMGGAAGYTTWTGGGC
1-2-2-3.	pearl-DMT-F2	TCGGAARTGACATACAGGAAGTYATHGG
1-2-2-3.	pearl-DMT-R2	GAGGGCAAAGKGGGARYTG
1-2-2-3.	RACE-P-F1	GCCCAWARCTTCCAAAARCTGAA
1-2-2-3.	RACE-P-F2	CCDATRACTTCTGTATGTCAATTCCGA
1-2-2-3.	RACE-P-R2	CARYTCCCMTTTGCCCTC
1-2-2-3.	5'PCR	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT
1-2-2-3.	CDSⅢ adapt	ATTCTAGAGGCCGAGGCGGCCGACAT
1-2-2-3.	TSS-F	ACCAGCAGTGAAACAATTATGAGAGAG
1-2-2-3.	sDMTRP_R	CCTGCCCATATAGGTATCTTGTGATTGGA
1-2-2-3.	FSD-F	TTTTCAGATCCAGCACACAGAG
1-2-2-3.	FSD-R	CTCTGTGTGCTGGATCTGAAAA
1-2-2-3.	5'PCRinner	AGTGGTATCAACGCAGAGTGGCATT
1-2-2-3.	NotIADPN	AACTGGAAGAATTGCGGGCC
1-2-2-3.	NotIADPN2	TTGCGGGCCGAGGAA
1-2-2-3.	DMT3	GAYATGCARGARGTNATHGG
1-2-2-3.	DMT7	ACRAANCCYTCCATNACRAAYTG
1-2-2-3.	DMT6	CCNGWRTANGTNCCNGTCAT
1-2-2-3.	DMT-S2	GCTGAAGGTAATCCTCATGCTG
1-2-2-3.	DMT-A1	CCATCACCATGATCAGGAATGT
1-2-2-3.	DMT-A4	TCCTGGATCTAAGTAAGCTATACTCATCA
1-2-2-3.	DMT-A5	CTGACATCAGAACCCATAGCAACCT
1-2-2-3.	DMT-A6	TGGCTGACATCAGAACCCATAGCAACCT
1-2-2-3.	5'-primer	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT
1-2-2-3.	tDMT-Mg-F	CAAGGAGACATTCTGATCGGAATGTGG
1-2-2-3.	tDMT-Mg-R	GTGGAGATATATATTGTGTGGCAT
1-2-3-3.	Toyst-5UTR	GTAATGACTTATGGACAACCTTTTAT
1-2-3-3.	Toyst-841R	ATGATACGGGATAATACTAGTGAAC
1-2-3-3.	Toyst-841F	GTTCACTAGTATTATCCCGTATCAT
1-2-3-3.	Toyst-3UTR	ATAACGTAATAAGTCAAGACGCGGT
1-2-3-3.	681F	GGGGCGTTTCTATACATATACATCA
1-2-3-3.	1190R	AACTCGTTTCCATTTTGCCCACTTAA
1-2-3-3.	oyst-5UTR	GAGAGATTGATAATATGAGCGAGGA
1-2-3-3.	oyst-3UTR	TCATAAAGCTCCTAATTGCAATTCC
1-2-3-3.	oyst-906F	GAAAGACCAAGTGCAGGAGGCGAAC
1-2-3-3.	oyst-906R	GTTGCGCTCCTGCACTTGGTCTTTC
1-2-3-3.	LCO1490	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG
1-2-3-3.	HCO2198	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA
1-2-3-4.	T7	TAATACGACTCACTATAGGGCG
1-2-3-4.	SP6	ATTTAGGTGACACTATAGAATACTCAAG
1-2-6-6.	DMT-F	TGGCAGAACAGTTAGATGGG
1-2-6-6.	DMT-R	TGTGGATCTTCTGGAATGGA
1-2-6-6.	DMT-P	CCACGTTTGACCTCGGTGGC
1-2-6-6.	CgRP-F2	GGGACGTATGCTGGTCAGTT
1-2-6-6.	CgRP-R2	AGGTCATTTGTTGCTGCCAA
1-2-6-6.	CgRP-P	CGCGATGGTGCCCACTATTACCGT

表 1-2. シチヨウシンカイヒバリガイおよびマガキ DMT-1、DMT-2 の塩基数・アミノ酸残基数。

	DMT-1		DMT-2	
	塩基数	アミノ酸残基数	塩基数	アミノ酸残基数
シチヨウシンカイヒバリガイ	1,605 nt	535 aa	1,617 nt	539 aa
マガキ	1,731 nt	577 aa	1,578 nt	526 aa

表 1-3. 重金属曝露によるシチヨウシンカイヒバリガイ及びマガキの 7 日後生残数。

	投与量 (ug/L)	人工海水への 馴致日数	重金属への 曝露期間	開始時個体数 マガキ シチヨウシンカイヒバリガイ	生残数（生残率） マガキ シチヨウシンカイヒバリガイ
カドミウム	100	2 日	7 日	7 7	7(100%) 5(71%)
水銀	50			7 8	7(100%) 6(75%)
鉛	100			7 7	7(100%) 5(71%)
銅	50			7 7	7(100%) 7(100%)
亜鉛	100			7 7	7(100%) 6(86%)
鉄	100			7 7	7(100%) 6(86%)
コントロール	-			7 5	7(100%) 4(80%)

表 1-4. シチヨウシンカイヒバリガイコントロール全組織におけるリアルタイム PCR の結果を TukeyHSD (* $p<0.05$) で解析を行った結果。○が有意差があったところを示す。

	AM	BM	F	G	I	K	L	M	Go	H
AM				○						
BM				○						
F				○		○	○			○
G	○	○	○						○	
I										
K			○							
L			○							
M										
Go				○						
H			○							

第二章

オニヒトデ DMT 様配列の単離と構造

2-1. 序論

第一章において、シチヨウシンカイヒバリガイおよびマガキを用いて DMT 様配列の単離を試みたところ二つの DMT 様配列の単離に成功し、それぞれ仮に DMT-1 および DMT-2 と命名した。しかし、貝類において両者の発現量が少ない、あるいは立体構造やスプライシングの過程が複雑である可能性が考えられたため、本章以降はオニヒトデ *Acanthaster planci* を用いて DMT 様輸送体の解析を行うことにした。

オニヒトデは、ヒトデの仲間の中ではほぼ最大種であり、生きたハードコーラル (Scleratinia) の表面組織をエサとし、その景観を損ねることから、その大量発生は時に「疫病」とも称される種であるが (図 2-1) (Lucas, 2013)、そのゲノム情報は精密に解析されて充実しており、網羅的なトランスクリプトーム情報が得られている (Hall et al., 2017)。また、オニヒトデの属する棘皮動物門はすべての生物が海産動物であり、常に海洋環境の中で進化を重ねてきた。棘皮動物はその生息環境の広さと金属影響の評価のしやすさから、海洋環境モニタリングやリスク評価プログラムによく用いられている (Migliaccio et al., 2014, 2015)。さらに、後口動物であるため、DMT の研究が進んでいる哺乳類との比較研究もしやすいと考えられる。本章では、オニヒトデから DMT 様遺伝子の探索を行い、ふたつの DMT 様 cDNA を単離した。そして、コードされるアミノ酸配列について、膜貫通部位や、機能上重要と考えられる配列の保存性の検討を試みた。次に、単離した ApDMT-1 および ApDMT-2 の構造解析、特に金属結合部位に隣接するアミノ酸残基 Asn, Asp, Ala, Met 近傍の立体構造の比較を行った。放射線抵抗細菌 *Deinococcus radiodurans* の NRAMP ファミリーに属する金属輸送体である MntH (マンガントランスポーター)、DraNramp の結晶構造、およびブドウ球菌 *Staphylococcus capitis* DMT (ScaDMT) の結晶構造はすでに決定されている (Bozzi et al., 2016, Ehrnstorfer et al., 2014)。DraNramp、ScaDMT とともに 12 の膜貫通部位 (原著では区切り方が異なるため 11 と表記されている) および 1 箇所の金属結合部位が存在し、このうち第一膜貫通部位のアミノ酸残基が金属輸送において重要であることが報告されている (Bozzi et al., 2016)。これら配列を元に、機能に関して重要とされるアミノ酸残基の保存や、DMT-1 と DMT-2 の立体構造の比較を試みた。

2-2. 材料と方法

2-2-1. オニヒトデ DMT-1、DMT-2 の単離

2-2-1-1. 生物試料

沖縄県恩納村において、オニヒトデー斉駆除の際に捕獲され、沖縄科学技術大学院大学 (OIST) において飼育されていた個体を用いた (図 2-2)。個体は OIST から千葉県柏市の

大気海洋研究所まで空輸し、輸送開始と同日中の到着後直ちに解剖を行った。Fragments Per Kilobase of exon per Million mapped reads (FPKM) の値より DMT が高発現であることが予測されている胃 (https://marinegenomics.oist.jp/cots/blast/search?project_id=46, 図 2-3、2-4) を取り出し、液体窒素によって急速冷凍し、使用まで -80°C において凍結保存した。

2-2-1-2. RNA 抽出と cDNA 合成

取得した胃から TRIsure (Meridian Bioscience, Cincinnati, OH, USA) を用いて Total RNA を抽出し、Deoxyribonuclease I、Amplification Grade を用いて DNase 処理を行った。RT-PCR は SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR を用いて、455 ng の total RNA から二本鎖 cDNA プールを合成し、PCR 用 cDNA テンプレートとして使用した。

2-2-1-3. プライマー設計

NCBI の オ ニ ヒ ト デ ゲ ノ ム デ ー タ ベ ー ス (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/7870?genome_assembly_id=301786) において、ホタテガイ *Mizuhopecten yessoensis* DMT 配列 (GenBank: BAD99106.1) をクエリーに遺伝子探索を行い、得られた配列 (oki.52.88.t1, oki.52.27.t1) を参考にプライマーを設計した。作成したプライマーを、表 2-1 に示す。また、この遺伝子探索において、DMT 様配列を二つ取得した。これらを本章においては、ApDMT-1 と ApDMT-2 と示す。

2-2-1-4. cDNA の単離

PCR には KOD-plus-DNA ポリメラーゼを使用し、反応液は添付のプロトコールに従って調製した。サーマルサイクラー条件は、94°C で 2 分間の初期変性を行った後、94°C で 15 秒、60°C で 30 秒、68°C で 2 分 30 秒を 35 サイクル行い、72°C で 7 分間の最終伸長を行った。増幅産物を T-vector にサブクローニングする場合は、最後のサイクルの前に 5 µL Ex Taq (Takara Bio Inc.) を添加した。この手順は、特に記載がない限り、他の PCR 実験にも用いた。ApDMT-2cDNA はプライマー ApDMT-5UTR および ApDMT-3UTR を用いて増幅した。同様に、ApDMT-1cDNA はプライマー ApRP-5UTR および ApRP-3UTR を用いて増幅した。

2-2-1-5. サブクローニングとインサートチェック

2-2-1-4.で得られた PCR 産物は、1%アガロースゲルを用いた電気泳動により分離し、予想される長さのバンドを切り出した。その後、QIAquick Spin を用いて、切り出したゲルから DNA 断片を抽出・精製した。精製した DNA 断片は、TA-cloning 法により T-Vector pMD19 (Simple) ベクター (Takara Bio Inc.) に組み込んだ。研究室において ECOSTM Competent E. coli XL1-Blue (Nippon Gene CO.) より作成したコンピテントセルを用いた形質転換を行った後、LB 培地上で 37°C で一晩培養した。培養後、M13-RV と M13-M4 プライマーを用いて、コロニーダイレクト PCR を行った。この PCR は、AmpliTaq Gold PCR Master Mix DNA ポリメラーゼを用いて、添付のプロトコールに従って反応液を調製した。反応条件は、95°C で 5 分間熱変性を行った後、95°C で 15 秒の熱変性・55°C で 15 秒のアニーリング・72°C で 2 分 30 秒の伸長反応のセットを 28 サイクル行い、その後 72°C で 7 分間伸長反応を行った。PCR 反応後、得られた PCR 産物全量を 1.5%アガロースゲルを用いて電気泳動を行い、増幅及び PCR 産物のサイズを確認した。

2-2-1-6. プラスミド抽出

2-2-1-5.におけるインサートチェックにより、正しいサイズにおける増幅が確認された形質転換体を、液体 LB 培地 5 mL 中へ植菌し、37°C で一晩振盪培養した。培養産物から cSpin Miniprep Kit を用いてプラスミドを抽出し、配列決定に用いる鋳型とした。

2-2-1-7. 配列決定

Big Dye Terminator 3.1 Cycle Sequencing Kit を用いて、2-2-1-6.で精製したプラスミド DNA に対してサイクルシーケンス反応を行った。反応液の組成は添付のプロトコールに従った。反応条件は、最初に 96°C で 1 分間熱変性を行った後、96°C で 10 秒の熱変性・50°C で 5 秒のアニーリング・60°C で 4 分のサイクルを 28 回繰り返し、最後に 60°C で 7 分間伸長反応を行った。その後精製を行い、ABI PRISM 3130X1 Genetic Analyzer により塩基配列を決定した。得られた塩基配列は、Genetyx Ver.11 を用いて解析を行った。

2-2-1-8.近隣結合法による系統解析

MAFFT version 7 (Katoh et al., 2018, Katoh & Standley, 2013) 上で 2-2-1-7.において配列を決定したオニヒトデ DMT-1、DMT-2 およびシチヨウシンカイヒバリガイ・マガキから得られた DMT-1 と DMT-2 配列をアラインメントした。その結果を用いて、同じく MAFFT 上で NJ 法により、JTT モデルを用いて簡易的に分子系統解析を実施した。

2-2-2. 構造解析

2-2-2-1. 膜貫通部位予測・モチーフ検索・シンテニー解析

膜貫通部位予測には、Phobious (Käll et al., 2004) を用いた。

保存されたモチーフの検索には Multiple Em for Motif Elicitation Version 5.1.1 (MEME, <http://meme-suite.org/tools/meme>) (TL Bailey, 1994) を用い、最大検出モチーフ数を 5 に設定した以外はパラメーターを初期値に設定した。

シンテニー解析のため、NCBI オニヒトデゲノムデータベース (Accession: PRJNA397419) より、ヒットした配列の上流および下流の遺伝子情報を取得した。比較対象として、同じくヒトデ目であるヨーロッパヒトデ *European starfish* (*Asterias rubens*, Accession: PRJNA626669) のゲノム情報を利用した。

2-2-2-2. 構造解析

一次構造の比較は、DraNramp (Accession: Q9RTP8) 及び ScaDMT (ACCESSION number: 4WGV_A) を用いて、MAFFT version 7 によってアラインメントを行った。

3D モデルは DraNramp (PDB ID 5KTE) 及び ScaDMT (PDB ID 4WGW) の構造をベースに SWISSMODEL (Bertoni et al., 2017, Bienert et al., 2017, Guex et al., 2009, Studer et al., 2020, Waterhouse et al., 2018) を使ってホモロジーモデルによって構築した。金属結合部位における機能に重要なアミノ酸残基と金属との距離は、DraNramp (PDB ID 6bu5.1.A) を用い、同様に SWISSMODEL を使ってホモロジーモデルによって構築した図上で、PyMOL (DeLano, W., 2002) を用いて測定した。測定は、Qin et al. (2017) に従い、機能に重要なアミノ酸残基 DPGN のうち D と N および、MPH の 3 アミノ酸残基上流側にある A を用い、そのアミノ酸を構成する酸素原子との距離を測定した。このうち、N と A は側鎖上に存在する酸素原子を用いた。全ての画像は、PyMOL を用いて作成した。

進化的保存性の解析には ConSurf server (Ashkenazy et al., 2010, Celniker et al., 2013) を用い、PyMOL によって描画した。ConSurf による解析は全て初期設定を用いた。解析には、ふたつの DMT 様配列が認められた種の配列を用いた (表 2-2, 2-3)。それぞれ DMT-1 であるか DMT-2 であるかは分子系統解析 (第三章参照) により判断した。

2-3. 結果

2-3-1. オニヒトデ DMT、DMTRP の単離

遺伝子探索を行った結果、オニヒトデから二つの DMT 様配列を単離することに成功した (図 2-5)。ApDMT-1 は 1,725 nt で 575 アミノ酸残基をコードしており、ApDMT-2 は

1,929 nt で 643 アミノ酸残基をコードしていた。これら配列の相同性は 50.27%であった。簡易的な分子系統解析の結果、ApDMT-1 は貝類の DMT-1 と、ApDMT-2 は貝類の DMT-2 との配列の類似性が高く、それぞれ相同であると考えられた (図 2-6)。

2-3-2. 構造解析

2-3-2-1. 膜貫通部位予測・モチーフ検索・システニー解析

膜貫通部位は両者とも 12 か所推定され、それぞれの N および C 末端は細胞内領域に突出していると推定された。

ApDMT-1 と ApDMT-2 は、16 あるいは 17 個の exon から構成されており、このうち 9 か所の intron が共通して保存されていた (図 2-5)。なお、両遺伝子は同一の Scaffold 上の 900kb 以上離れた位置 (図 2-7) に存在したが、当該 Scaffold が染色体上にマップされていないものであったため、両遺伝子の染色体上の位置は明らかにできなかった。

モチーフは、各 ApDMT-1 と ApDMT-2 において同じモチーフが同じ順序で検出された (図 2-8)。

システニー解析を行った結果、オニヒトデは DMT-1、DMT-2 とともに同一の scaffold 上に位置していたのに対し、ヨーロッパヒトデの DMT-1 は 15 番染色体上に、DMT-2 は 3 番染色体上に存在していることが明らかとなった (図 2-9)。オニヒトデ DMT-1 および DMT-2 が位置している scaffold、oki_scaffold52 (図 2-9 (a)) において、ApDMT-1 および ApDMT-2、両遺伝子の周辺に共通して保存されている遺伝子はなかった。次に、オニヒトデ DMT-1 をヨーロッパヒトデ DMT-1 と、オニヒトデ DMT-2 をヨーロッパヒトデ DMT-2 と比較した (図 2-9 (b))。その結果、DMT-1 のすぐ下流で DNAH6 が、DMT-2 の上流で PYM1 と BLOC1S2 が保存されていたが、概して上流、および下流遺伝子の保存性は低かった。

2-3-2-2. 構造解析

ApDMT-1 と DraNramp では 32.56%、ApDMT-1 と ScaDMT では 37.47%、ApDMT-2 と DraNramp では 31.65%、そして ApDMT-2 と ScaDMT では 36.32%、のアミノ酸残基が保存されていた (表 2-4、図 2-10～図 2-13)。

これら配列をもとに 3D モデルを作成したところ、図 2-14、2-15 のようになった。金属結合部位が外向きに開口し、中心にマンガンが配置されている場合の 3D モデルは、図 2-15、2-16 のようになった。ApDMT-1 では、Ala→Mn: 6.2 Å、Asn→Mn: 3.4 Å、Met→Mn: 2.9 Å、Asp→Mn: 3.5 Å となり、ApDMT-2 では Ala→Mn: 5.9 Å、Asn→Mn: 3.4 Å、Met→Mn: 2.8 Å、Asp→Mn: 3.2 Å となった。

次に、DMT-1 と DMT-2 の構造が進化の過程でどれくらい保存されてきたのかを検討するために、DMT 様配列が複数検出された生物の配列を用いて、進化的保存性を解析した（図 2-18、2-19）。その結果、金属取込の際の開口部近辺においては、DMT-1、DMT-2 とともに全体的に保存的であり、かつ両者の間に明瞭な差はなかった。金属取込の際の開口部近辺においては、ApDMT-1、ApDMT-2 共に、機能に影響を及ぼすと考えられる明瞭な差はなかった。

2-4. 考察

本章では、オニヒトデから 2 種類の DMT 様 cDNA 配列を単離した。配列の単離においては、第一章における貝からの単離の場合とは異なり、スムーズに単離を進めることができた。オニヒトデにおいては、精密なゲノムデータが利用できたこともあるが、FPKM 値（図 2-3）からも支持されるように、mRNA 発現レベルも十分に高かったと考えられる。

単離した 2 種の DMT 様配列 ApDMT-1 および ApDMT-2 は、互いに配列に類似性があり、膜貫通部位・intron の配置・consensus transport motif の位置と配列・機能に重要なアミノ酸残基の共通性は、互いに高く保存されていた（図 2-5）。これらの情報は、両タンパク質が同じ輸送体ファミリーに属し、似た機能を持つことを示唆している。

構造解析の結果も、ApDMT-1 と ApDMT-2 の立体構造には大きな違いはないことを示唆した。ApDMT-1の方が、ApDMT-2よりも、マンガンを中心に配置した、外向きに開口している場合のモデルにおいて、若干金属とアミノ酸残基の間の距離が遠いということが明らかとなったが、機能に差があると結論づけるには至らなかった。また、進化的保存性についても、DMT-1、DMT-2 はどちらも保存的な部分が多く、かつ両者の間で大きな差が見られなかったことから、両者の分子進化過程において、極端な構造変化は起こっていないと考えられる。

DMT と DMTRP は構造上の類似性が高く、共通の祖先遺伝子の重複によって誕生した可能性が高い。重複が比較的最近の遺伝子の縦列重複によるものであれば、両者はゲノム上極めて近い位置に存在することが多い。また、重複が染色体重複または染色体の部分重複によって生じたとすれば、その痕跡は近隣遺伝子の類似性（シンテニー）として残っている可能性がある。そこで、オニヒトデ・ヨーロッパヒトデのゲノム上の DMT および DMTRP の位置と周辺遺伝子の比較を行った（図 2-9）。ApDMT-1 および ApDMT-2 の起源については、両遺伝子は同一の scaffold 上に存在していたものの、その距離が 900 kb 以上離れていた（図 2-7）。同様に、ヨーロッパヒトデの DMT-1 および DMT-2 はそれぞれ別の染色体上に位置していた（図 2-9 (b)）。またオニヒトデとヨーロッパヒトデの DMT-1、DMT-2 双方において、周辺遺伝子の保存性が低かったことから（図 2-9）、DMT 様配列は最近の縦列重複によ

って生じたのではなく、起源が古いことが示唆され、これは図 2-6 において相同であったという結果と矛盾しない。オニヒトデにおいて同一染色体に乗っているのは、DMT と DMTRP は染色体重複によって生じ、別々の染色体上に位置した後、オニヒトデにおいてのみ染色体融合、あるいは同一染色体上への転座が偶然起こった可能性が考えられた。DMT あるいは DMTRP 近傍の遺伝子は共通したものは殆ど見られず、DMTRP が染色体重複で生じた遺伝子であるとしても、その起源はとても古いことが考えられた。

次章において、分子系統解析の視点からも両者の起源について考察する。

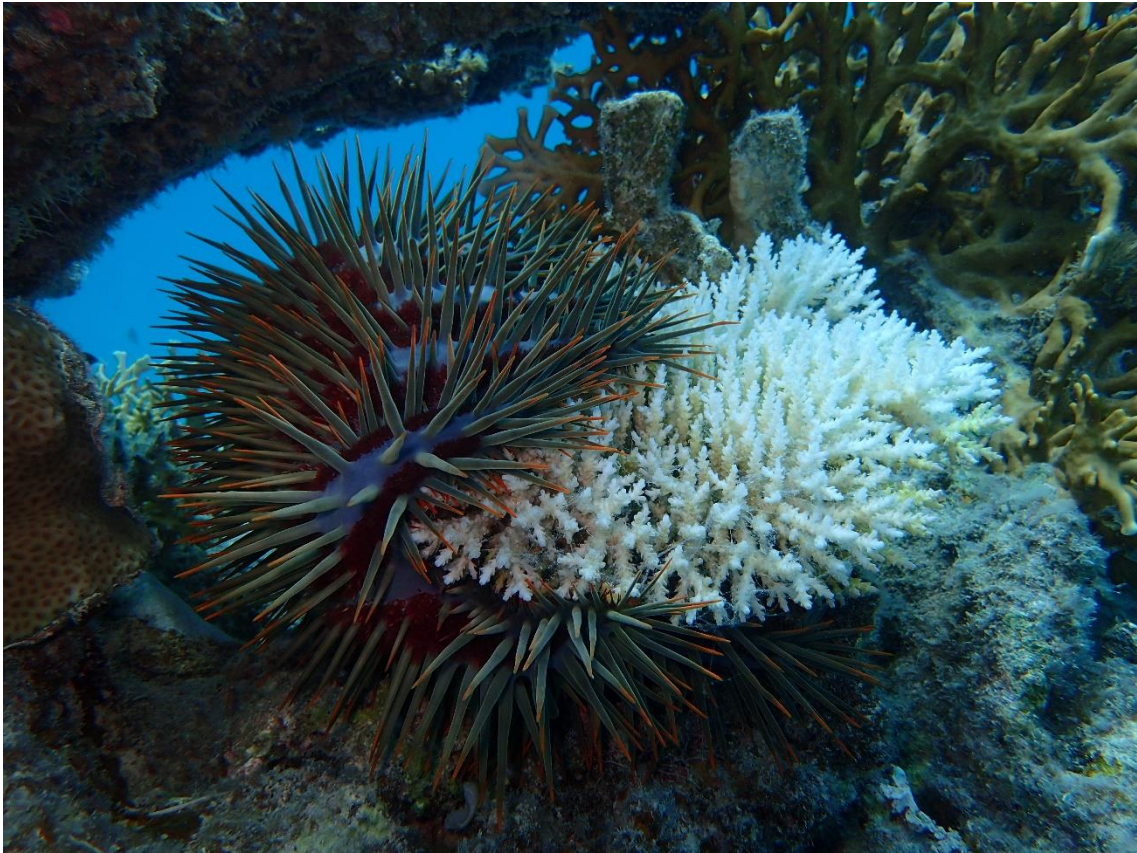


図 2-1. オニヒトデ *Acanthaster planci* がサンゴを捕食する様子（撮影：新里宙也博士・高木俊幸博士）



図 2-2. 本研究で使用したオニヒトデ *Acanthaster planci*。

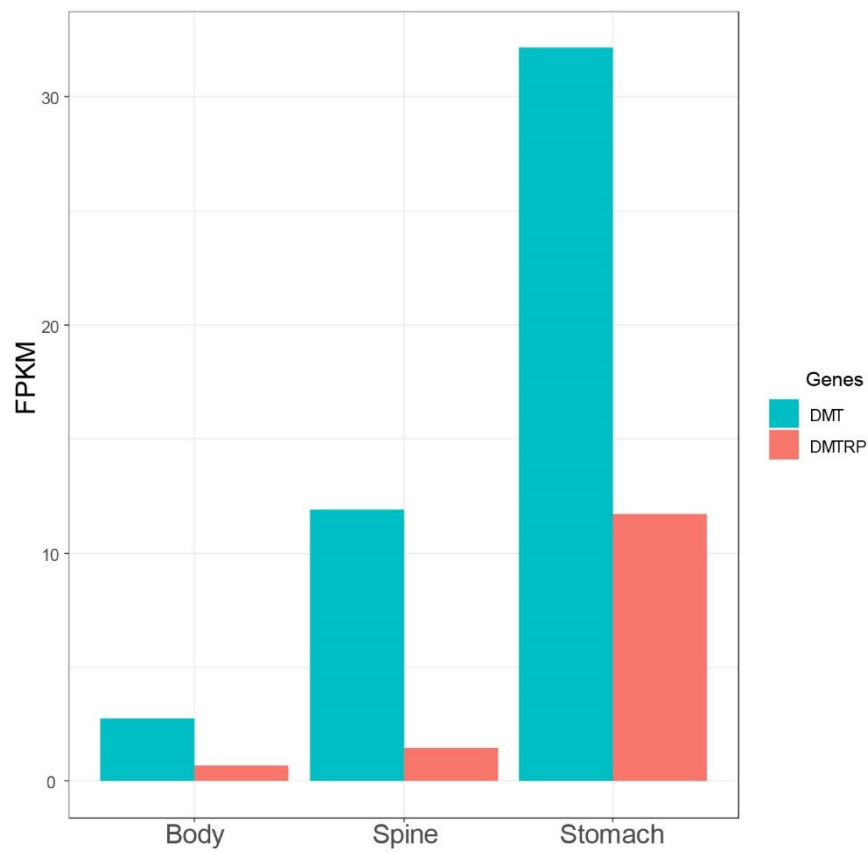


図 2-3. オニヒトデデータベースにおいて公開されている、DMT-1 および DMT-2 の FPKM 値。

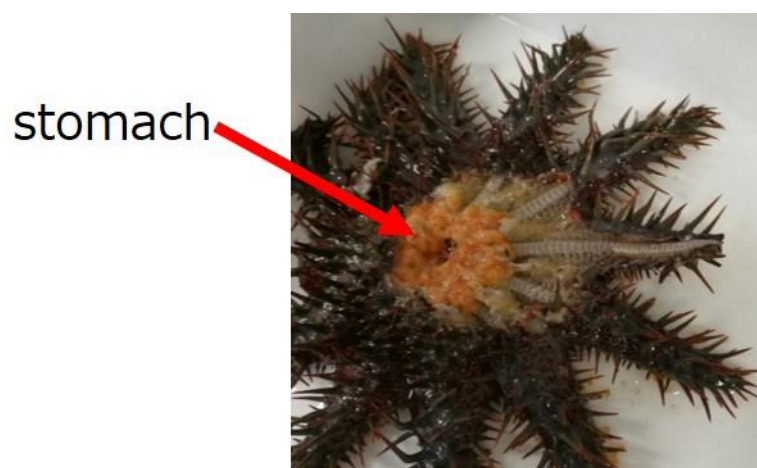


図 2-4. オニヒトデを解剖し胃を露出させたところ

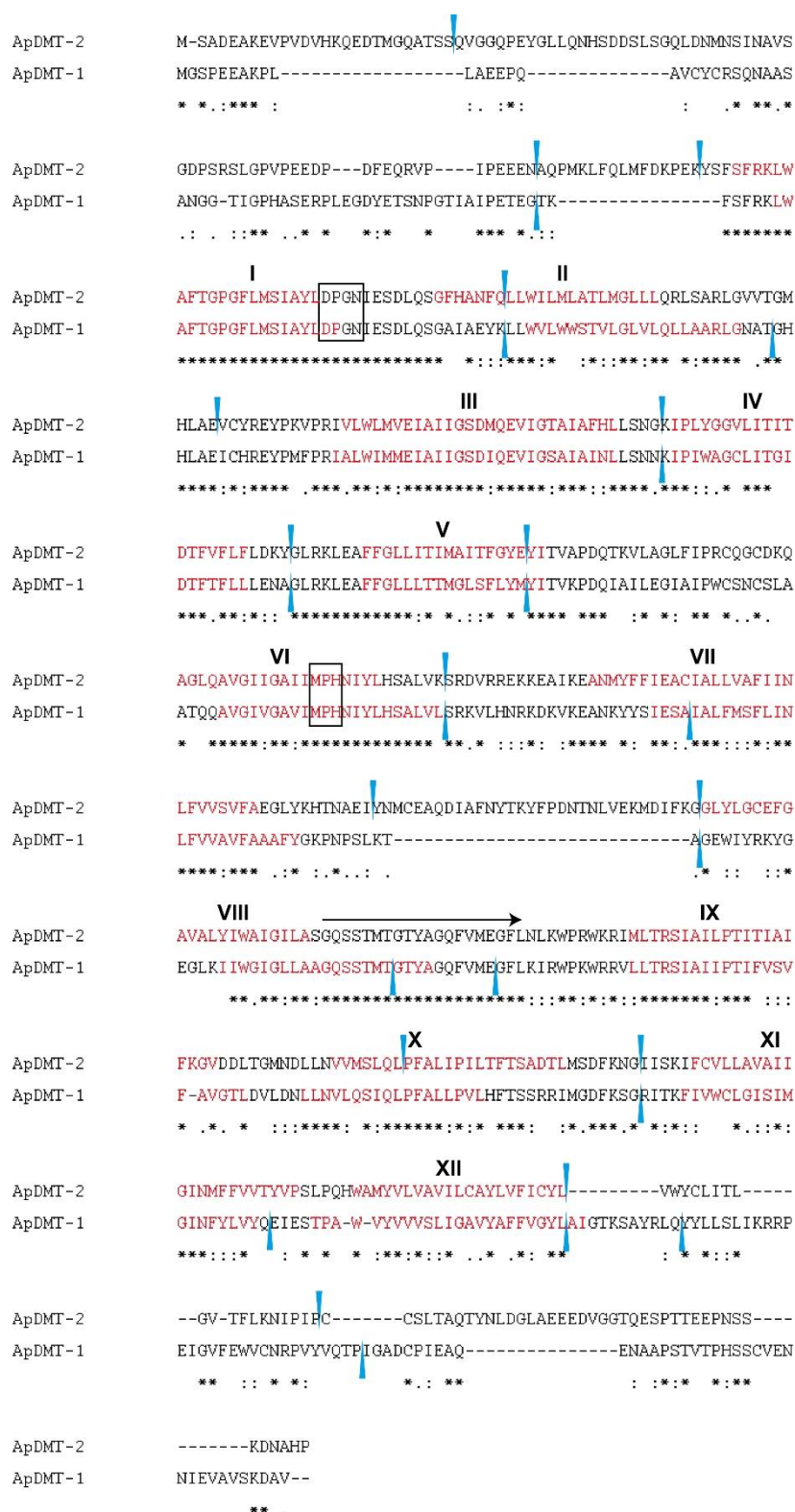


図 2-5. オニヒトデから取得した二つの DMT 様配列をアラインメントした図。赤は膜貫通部位を、ローマ数字はその順番を、青い三角はイントロンの位置、□（囲み）は機能に重要なアミノ酸残基を示す。

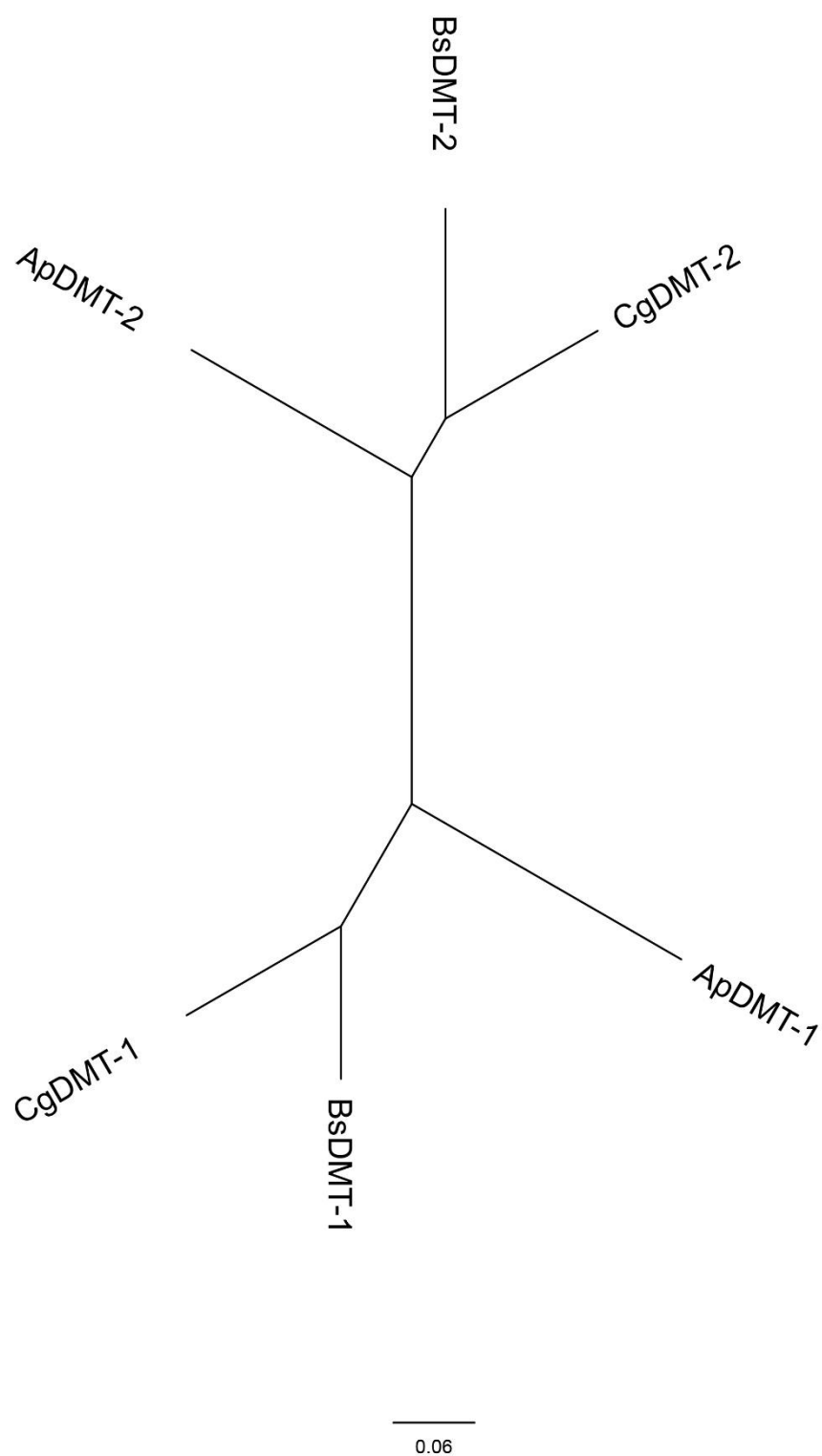


図 2-6.近隣結合法で作成した分子系統解析。スケールバーは1 座位あたり 0.06 置換の系統的距離を示す。

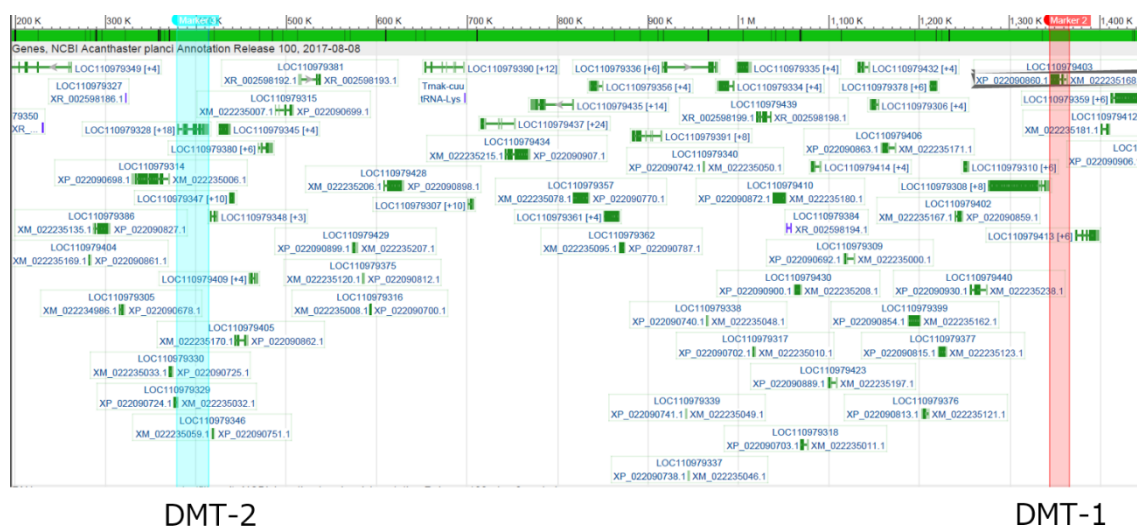


図 2-7. オニヒトデゲノムデータベースにおける oki_scaffold52 上での ApDMT-1 および ApDMT-2 のゲノム上の位置。最上段の数字が塩基の番号を示し、緑色の線がゲノムを表す。赤線で示した場所に DMT-1 が、青線で示した場所に DMT-2 が位置している。

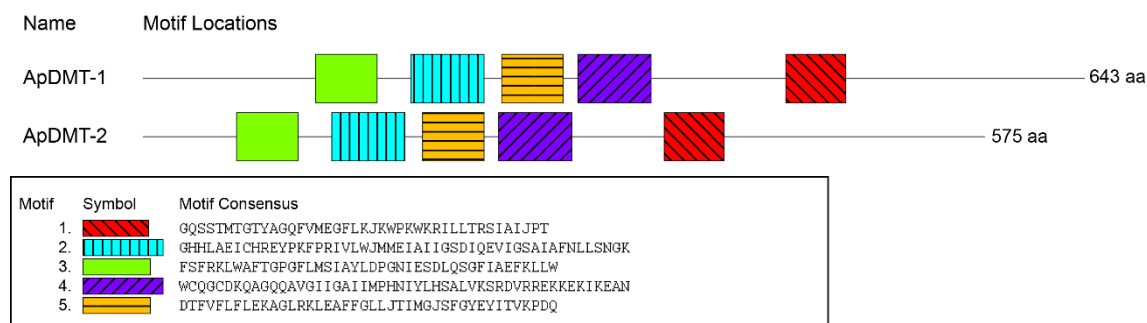


図 2-8. ApDMT1 と ApDMT2 の、モチーフの出現数と順序。MEME web server によって保存された領域を解析した。各色のボックスが検出されたモチーフを示す。



図 2-9. オニヒトデ DMT-1 と DMT-2 近傍遺伝子に関して、ヨーロッパヒトデとシンテニー解析を行った結果。オニヒトデ、ヨーロッパヒトデ間で保存されている遺伝子を線で結んで表示した。オニヒトデにおいても、ヨーロッパヒトデにおいても、DMT-1 遺伝子近隣の遺伝子と、DMT-2 遺伝子近隣の遺伝子の間に共通性は認められなかった。

ApDMT-1	1	MGSPEEAKP	LLAEEPQAVCYCRSQNAASANGGT	GPHASERPLE	EGDYETSNPGTI	AI	PEIT
Dr aNr a mp	1	MDSRSPSLP	-----	DDRP	DPPEQHL	DARAGATLRGT	
ApDMT-1	61	EGTKFSFRKL	WAFITGPGFLMSI	AYLDPGNI	ESDLQSGAI	AEYKLLWLL	WASTVLGLVLQL
Dr aNr a mp	32	AGPR-GVRR	ILPFLGPAVI	ASIAYMDPGNF	ATNIEGGARYGY	SLLWVIL	LAANLAMVILQN
ApDMT-1	121	LAARLGNAT	GHHIAELCHREYPMFPRI	ALWIMMELAI	IGSDIOEVI	GSALAI	AINLLSNKIL
Dr aNr a mp	91	LSANLGI	ASGRNLPELIRERWPRPLVWFYWI	QAE	LVAMATDL	AEFLGAALAI	QLLTG--L
ApDMT-1	181	PIWAGCLITGI	DTFTFLLEENAGLRKLE	AFFGLLLTMMGLSFL	LYMYITVKPDQI	AIL	LEGIL
Dr aNr a mp	149	PMFWGAVVT	GVVTFWLLNLQKRGTRPLE	LAVGAFVLMGVAYL	VQVVLARPDL	AAVGAGF	
ApDMT-1	241	AI	PWCSNCSLAATQOAVGI	VGAVIMPHNII	YLHSALVLSRKVL	HNRKDKVKE	ANKYYSIES
Dr aNr a mp	209	-VPRLQGP	GSAYL--AVGII	GATVMPHVIL	YLHSALTQGR	QTDTTEEK-	RRLVRLNRVDV
ApDMT-1	301	AI	ALFMSFLINLFVVAVFAA	FYGKPNPS---	LKTAGEWYRKY	CEGLKI	IWGVGLLAAG
Dr aNr a mp	265	I	AAMGLAGLINMSMLAVAAAT	FHGKNVENAGDLT	IAYQTLTPLL	GPAASVLF	AVALLASG
ApDMT-1	358	QSSTMTGT	YAGQFVMEGFLKIRWPKWRRV	LLTRSI	AIIPITIFVS	VFAVGTLDVLDNLLNV	
Dr aNr a mp	325	LSSSAVGT	MAGDVI MQGFMGFHI	PLWLRRLIT---	MLPAFIV	LLGMDPSSVLI	-LSQV
ApDMT-1	418	LQSIQLP	FALLPVLHFTSSRRIMGDFKSGRI	TKEIVWCLGI	SIMGINFYL	VYQEI	ESTPA
Dr aNr a mp	380	ILCFGV	PFALVPLLLFTARRDVMGALVTRRS	FVIGWIAVI	II	ALNGYLLWE	-----
ApDMT-1	478	WVYVVVSLI	GAVYAFFVGYLAI	GTKSAYRLQYYLLSLI	KRRPEI	DVFEW	CNRPVYVQTP
Dr aNr a mp	433	-----	LLGG-----	-----	-----	-----	-----
ApDMT-1	538	FGADCPI	EAQENAAPSTVTPHSS	CVENNI	EVAVSKDAV		
Dr aNr a mp		-----	-----	-----	-----	-----	-----

図 2-10. ApDMT-1 と放射線抵抗細菌 *Deinococcus radiodurans* (DraNramp) のアラインメント図。上段下段ともに背景が黒くなっているアミノ酸残基が同一であり、背景が灰色のアミノ酸残基が保存的であることを示す。

ApDMT-2 ScaDMT	1 1	MGSP EE AKPLLAEEPQAVCYCRSQNAASANGGTI GPHASERPLEGDYETSNPGTI AI PET MS-----
ApDMT-2 ScaDMT	61 3	EGTKFSFRKL WAFTGPGFLMSIAYLDPGNI ESDLOS GAI AEYKLLWLLWWS TVLGLVLQL -----VAVGYMDPGNWI TSMQGGAAQYGYTLLFVILI SSLAAMLQS
ApDMT-2 ScaDMT	121 44	LAA RLGNATGHH LAEICHREYPMFPRI ALWI MMELAI IGSDIQEVI GSAI AI NLLSN NKI MTVRLGIATGKDLAQMRHFLSKPVAIIFWIIAE LAI IATDI AEVI GSAI ALDLI FG- I I
ApDMT-2 ScaDMT	181 102	PIWAG C LIITGI DTFTFLLENAGLRKLEAFFGL LLTT WGLSFLYMYI TVKPDQI AI LEGI PLIVGALITVFDVFL LLFI MRFGFRKI EAI VGTLI FTVLAI FVFEVFI SSPQLTDI L NGF
ApDMT-2 ScaDMT	241 162	AI PWCSNCSLAATQQA VGI VGAVI MPHNI YLHSALVLSRKVL HNRKDKVKEANKYYSIES VPHKEI VTNQGI LYI ALGI IGATI MPHNI YLHSI VQSRKYDRHDNEEKAQAI KYATI DS
ApDMT-2 ScaDMT	301 222	AI ALFMSFLI NLFVVAVF AAAFY GKPNPSLKTAGEWI Y-----RKYGEGLKI I WGV NLQLSIAFVVNCLLLTLGAALFFGTKTNDLGGFYDLYHALKTEPVLGATLGGVMSTLFAV
ApDMT-2 ScaDMT	352 282	GLLAAGQSSTMTGT YAGQF VMEGFLKIRWPKWRRVLLTRSLAI I PTIFVSVFVAVGTLDVL ALLASGQNSTITGTLAGQIVMEGFLRLSIPNWLRRILTRSLAVIPVILII FKGNSEKI
ApDMT-2 ScaDMT	412 342	DNLL- - - NVLQSTQLP FALL PVLHFTSSRRI MGDFKSGRI TKFI VWCLGSI MGINFYLV EQLLVFSQVFLSI ALPFSLI PLQLATSNKKL MGPEI NKTWNI ISWTLI VILSGLNVYLI
ApDMT-2 ScaDMT	469 402	YQEI ES T PAWYVVVSLI GAVYAFFVGYLAI G T KSA YRLQYYLLSLI KRRPEI DVFEWVC IQTFQE-----LAL-----EV-LFQ---
ApDMT-2 ScaDMT	529	NRPVYVQT PF GAD CPI EAQENAAPSTVTPHSSCVENNI EVAVSKDAV

図 2-11. ApDMT-1 とブドウ球菌 *Staphylococcus capitis* DMT (ScaDMT) のアラインメント図。上段下段ともに背景が黒くなっているアミノ酸残基が同一であり、背景が灰色のアミノ酸残基が保存的であることを示す。

ApDMT - 2	1	MSADEAKEVPVDVHKQEDT MGQATSS QGNEELGSARELTLMGGQPEYGLLQNHSDDSLSG
DraNramp	1	M-----
ApDMT - 2	61	QLDNMNSI NAVSGDPSRSLGPVPEEDPD FEFQRVPIPEEENAQPMKLFQLMFDKPEKYSFS
DraNramp	2	-----DSRSPSLPDDRDPPEQHL DARAGATLRGTAGPR---G
ApDMT - 2	121	FRKLWAFITGPGFLMSTAYLDPGNI ESDLQSGFHANFQLLWLMMLATLMGLLLQRLSARLG
DraNramp	37	VRRI LPFLGPAVI ASIAYMDPGNFATNI EGGARYGYSLLWVILAANLMAVLIQNLSANLG
ApDMT - 2	181	VVTGMHIAEVCYREYPKVPRI VLWLMVEIAIIGSDMQEVI GTALAFHLLSNGKIPLYGGV
DraNramp	97	IASGRNLPELIRERWPRPLVWFYIQAELVAMATDLAEFLGAALAIQLLTG--LPMFWGA
ApDMT - 2	241	LIITITDTFVFLFLDKYGLRKLEAFFGLLITIMAITFGYEYITVAPDQTKVLAGLFI PRCL
DraNramp	155	VVTGVVTFWLLNLQKRGTRPLELAVGAFVLMGVAYLVQVVLARPDLAAGVAG-FVPRLQ
ApDMT - 2	301	GCDKQAGLOAVGIIGAIIMPHNIYLHSALVKSRI--DVRREKKEAIKEANMYFFIEACIA
DraNramp	214	G--PGSAYLAVGIIGATVMPHVIYLHSALTQGRITQDTTEEKRRLLVRLNR----VDVIAA
ApDMT - 2	358	LLVAFIITNLFVVSVFAEGLYKHTNAEINYMCEAODIAFNITKYFPDNTNLVEKMDIFKGG
DraNramp	268	MGLAGLI NMSMLAVAAATFHGK-----NVENAGDLTTAYQTLTP-----
ApDMT - 2	418	LYLGCEFGAVALYIWAIGI LASGQSSTMTGT YAGQFVMEGFLNLKWPRWKRI MLTRSI AI
DraNramp	307	-----LLGPAASVLF AVALLASGLSSSAVGTMAGDVI MQGFMGFHI PLWLR----RLITM
ApDMT - 2	478	LPTITIAIFKGVDDLTGMNDLLNVVMSLQLPFALIPI LTFISADTLMSDFKNGIISKIFC
DraNramp	358	LPAF-I VILLGMDP-SSVLI LSQVILCFGVPEALVPLLLFTARRDVMGALVTRRSFTVI G
ApDMT - 2	538	VLLAVAIIGI NMFFVVTYVPSLPQHWAMYVLVAVILCAYLVFI CYLVWYCLITLGVTFLK
DraNramp	416	WVI AVI IIALNGYLL-----M-----
ApDMT - 2	598	NIPI PCCSLTAQTYNLDGLAEEEDVGGTQESPTTEEPNSSKDNAHP
DraNramp	432	-----ELLGG-----

図 2-12. ApDMT-2 と放射線抵抗細菌 *Deinococcus radiodurans* (DraNramp) のアラインメント図。上段下段ともに背景が黒くなっているアミノ酸残基が同一であり、背景が灰色のアミノ酸残基が保存的であることを示す。

ApDMT-2	1	MSADEAKEVPVDVHKQEDT MGQATSSQGN EELGSARELTL MGGQPEYGL LQNHSDDSLSG
ScaDMT	1	MS-----
ApDMT-2	61	QLDNMNSI NAVSGDPSRSLGPVPEEDPD FEQRVPI PEEENAQPMKLFQL MFDKPEKYSFS
ScaDMT	3	-----
ApDMT-2	121	FRKLWAF TGPGLMSIAYLDPGNLESDLQSGFHANFQLLW LMLATLMGLLLQRLSARLG
ScaDMT	3	-----VAVGYMDPGNWI TSMQGGAAQYGYTL L FVI LI SSLAAMLQSMTVRLG
ApDMT-2	181	VVTGMHLAEVCYREYPKVPRIVLWLMVEIAITGSDMQEVI GTAT AFHLLSNGKIPLYGGV
ScaDMT	50	IATGKDLAQMTRHFLSKPVAIFWIAELAIATDAEVI GSAI ALDLIFG- IPLI VGA
ApDMT-2	241	LITITD T FVFLFLDKYGLRKLEAFFGLLITIMAITFGYEYITVAPDQTKVLAGLFI PRCO
ScaDMT	108	LITVFDVFLFLFMRFGFRKEAIVGTLI FTVLAI FVFEVFI SSPQLTDLI NG- FVPHKE
ApDMT-2	301	GCDKQAGLQ- AVGIIGAIIMPHNLYLHSA LVKSRDVRREKKEAI KEANMYFFIEACIALL
ScaDMT	167	I VTNQGI LYIALGIIGATIMPHNLYLHSSI VQSRKYDRHDNEEKAQAI KYATIDSNLQLS
ApDMT-2	360	VAFIINL FVVSVF AEGLYKHTNAE IYNMCEAQDI AFNYTKYFPDNTNL VEKMDI FKGGLY
ScaDMT	227	IAFVVNCLLLTL-----GAALFFGTKTNDLGGFYDLYHALKTEPV-----
ApDMT-2	420	LGCEFGAVALYIWAIGILASGQSSMTGT YAGCFVMEGFLNLKWPRWKRI MLTRSI AILP
ScaDMT	267	LGATLGGVMSTLFAVALLASGQNSTITGTLAGQI VMEGFLRLSI PNWLRRLI TRSLAVIP
ApDMT-2	480	TIT-IAIFKG- VDDL TGMNDLLNVVMSLQLPFALIPI LTFTSADTLMSDFKNGIISKI FC
ScaDMT	327	VII CLII FKGNSEKIEQLLVFSQVFLSI ALPFSLI PLQLATSNKKLMGPFI NKTWNIIS
ApDMT-2	538	VLLAVAIIGINMFFVVTYVPSLPQHWAMYVLVAVILCAYLVFI CYLVWYCLITLGVTF LK
ScaDMT	387	WTLI VILSGLNVYLI I QTF----QELALEVL FQ-----
ApDMT-2	598	NIPI PCCSLTAQTYNL DGLAE EEDVGGTQESPTTEEPNSSKD NAHP
ScaDMT		-----

図 2-13. ApDMT-2 とブドウ球菌 *Staphylococcus capitis* DMT (ScaDMT) のアラインメント図。上段下段ともに背景が黒くなっているアミノ酸残基が同一であり、背景が灰色のアミノ酸残基が保存的であることを示す。

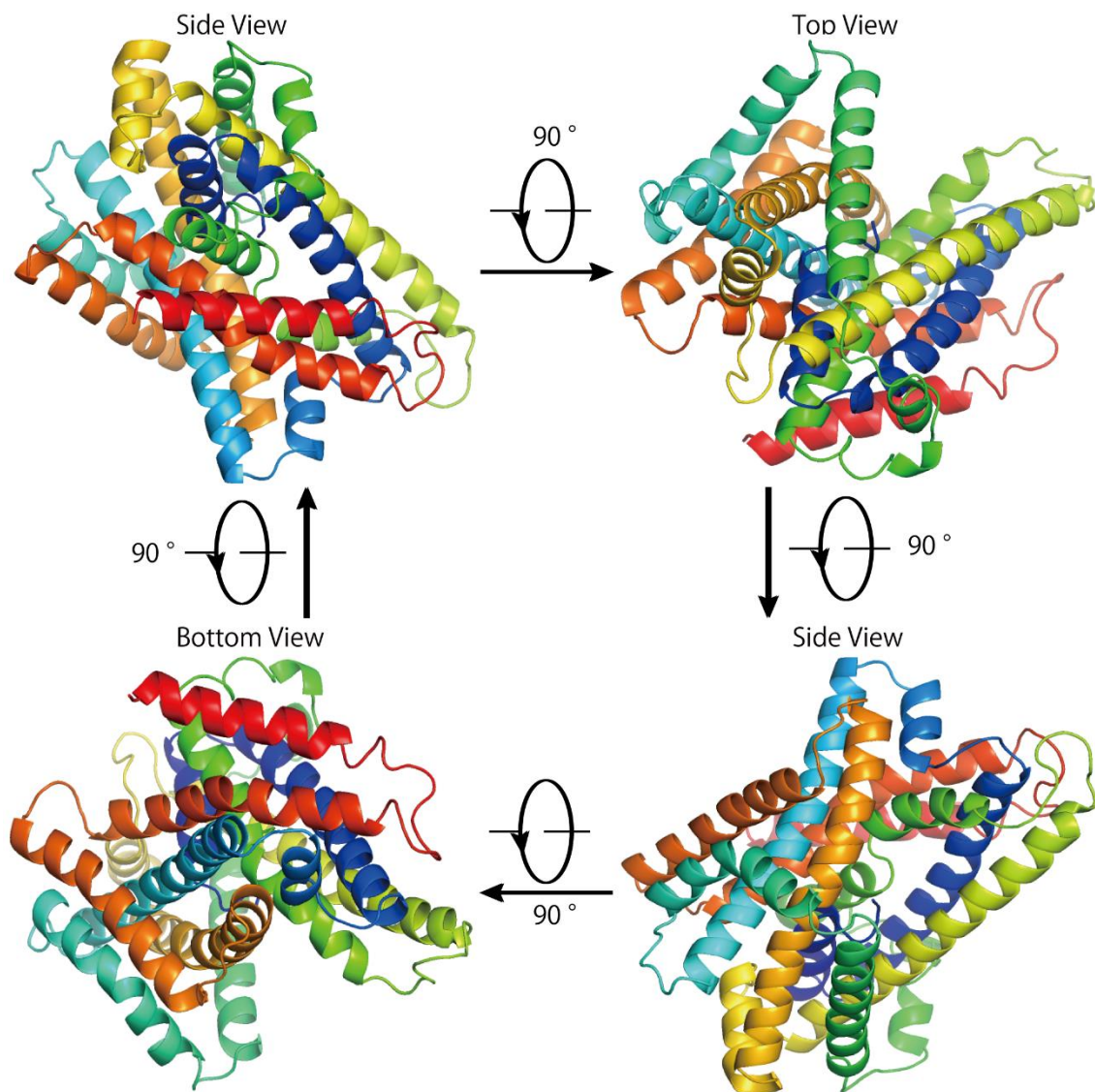


図 2-14. ScaDMT の構造をベースに構築した ApDMT-1 の 3D ホモロジーモデル。4 方向からの視野で表示した。各鎖ごとに自動で色付けをした。

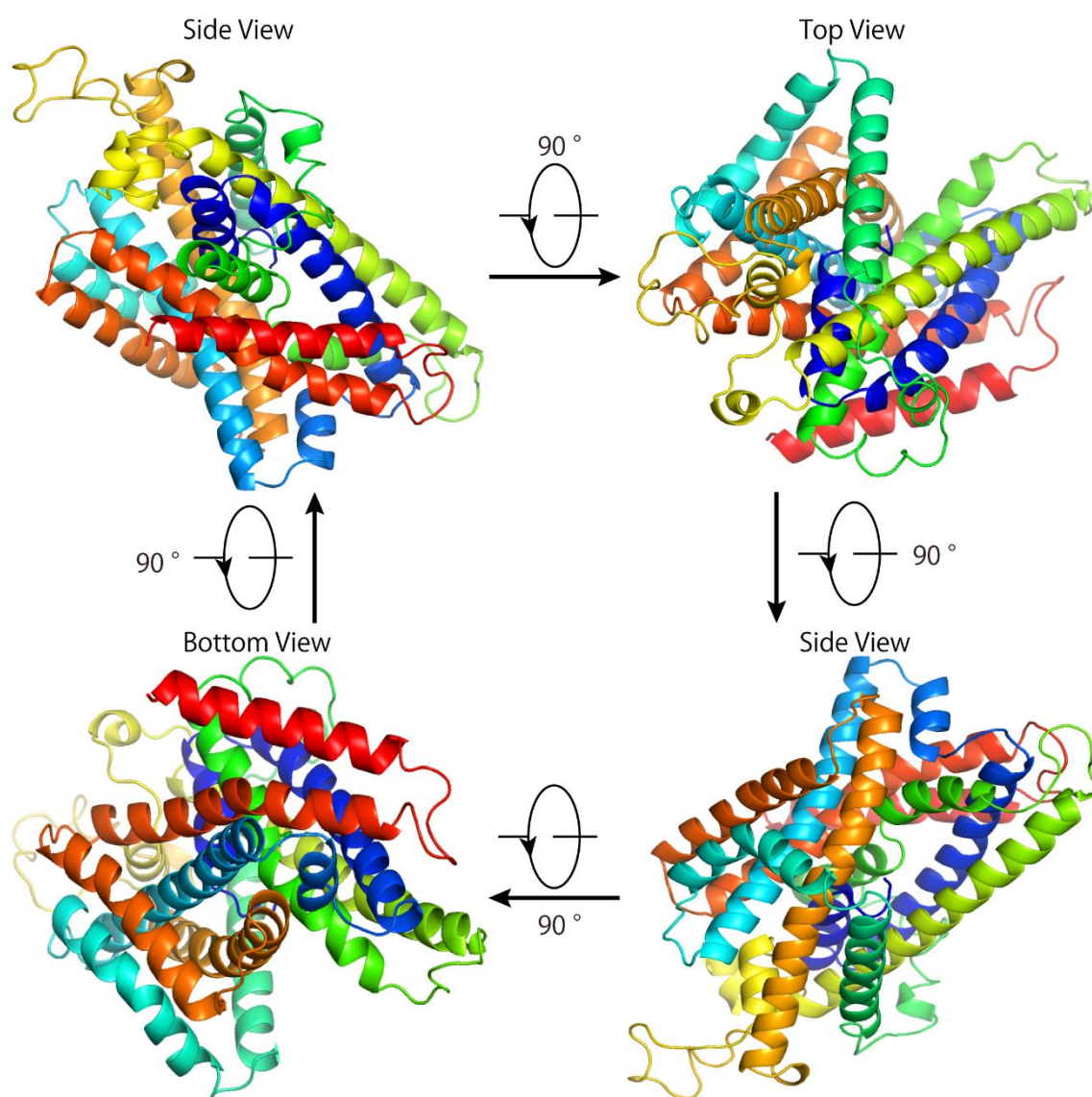


図 2-15. ScaDMT の構造をベースに構築した ApDMT-2 のホモロジーモデル。4 方向からの視野で表示した。各鎖ごとに自動で色付けをした。

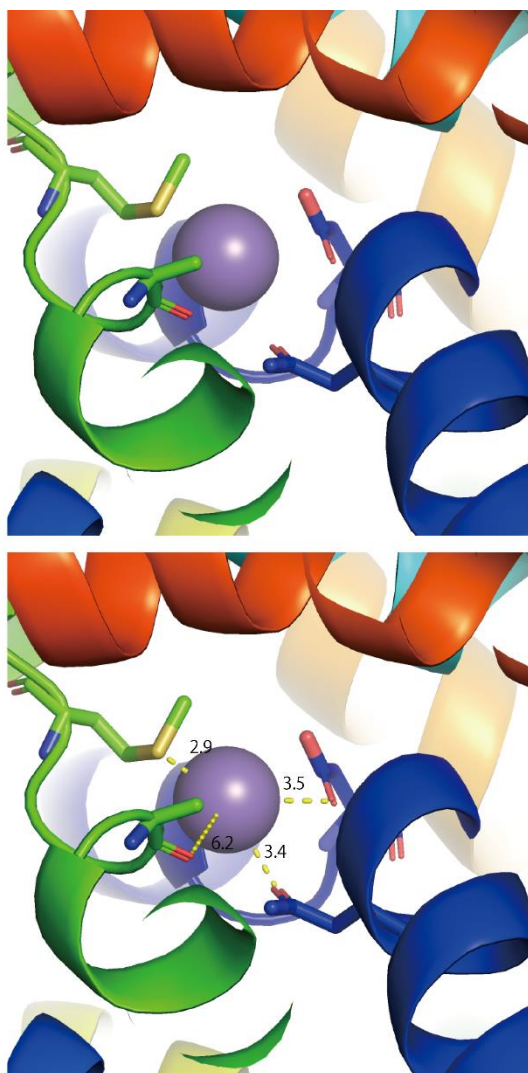


図 2-16. ApDMT-1 の機能に重要なアミノ酸残基とマンガンとの距離。金属結合部位にマンガン配置したモデルにおいて、近傍なアミノ酸残基 D, N, A, M の酸素原子からマンガンまでの距離を測定した。D, N, A, M はそれぞれスティック状に描写し、酸素原子を赤、窒素原子を青、硫黄原子をオリーブ色、炭素原子を緑色で示している。Ala→Mn: 6.2 Å、Asn→Mn: 3.4 Å、Met→Mn: 2.9 Å、Asp→Mn: 3.5 Å である。

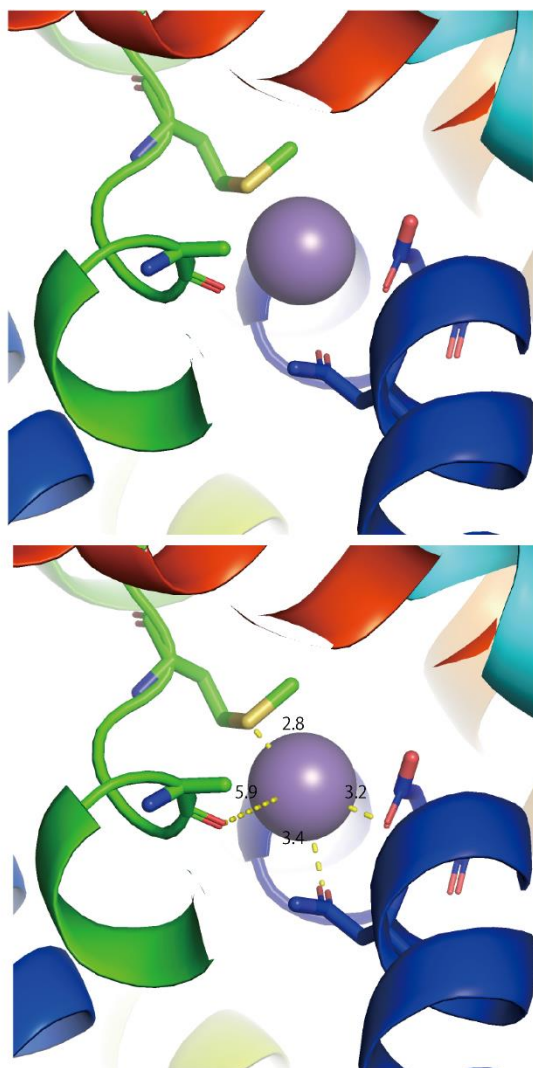


図 2-17. ApDMT-1 の機能に重要なアミノ酸残基とマンガンとの距離。金属結合部位にマンガン配置したモデルにおいて、近傍なアミノ酸残基 D, N, A, M の酸素原子からマンガンまでの距離を測定した。D, N, A, M はそれぞれスティック状に描写し、酸素原子を赤、窒素原子を青、硫黄原子をオリーブ色、炭素原子を緑色で示している。Ala→Mn: 5.9 Å、Asn→Mn: 3.4 Å、Met→Mn: 2.8 Å、Asp→Mn: 3.2 Å である。

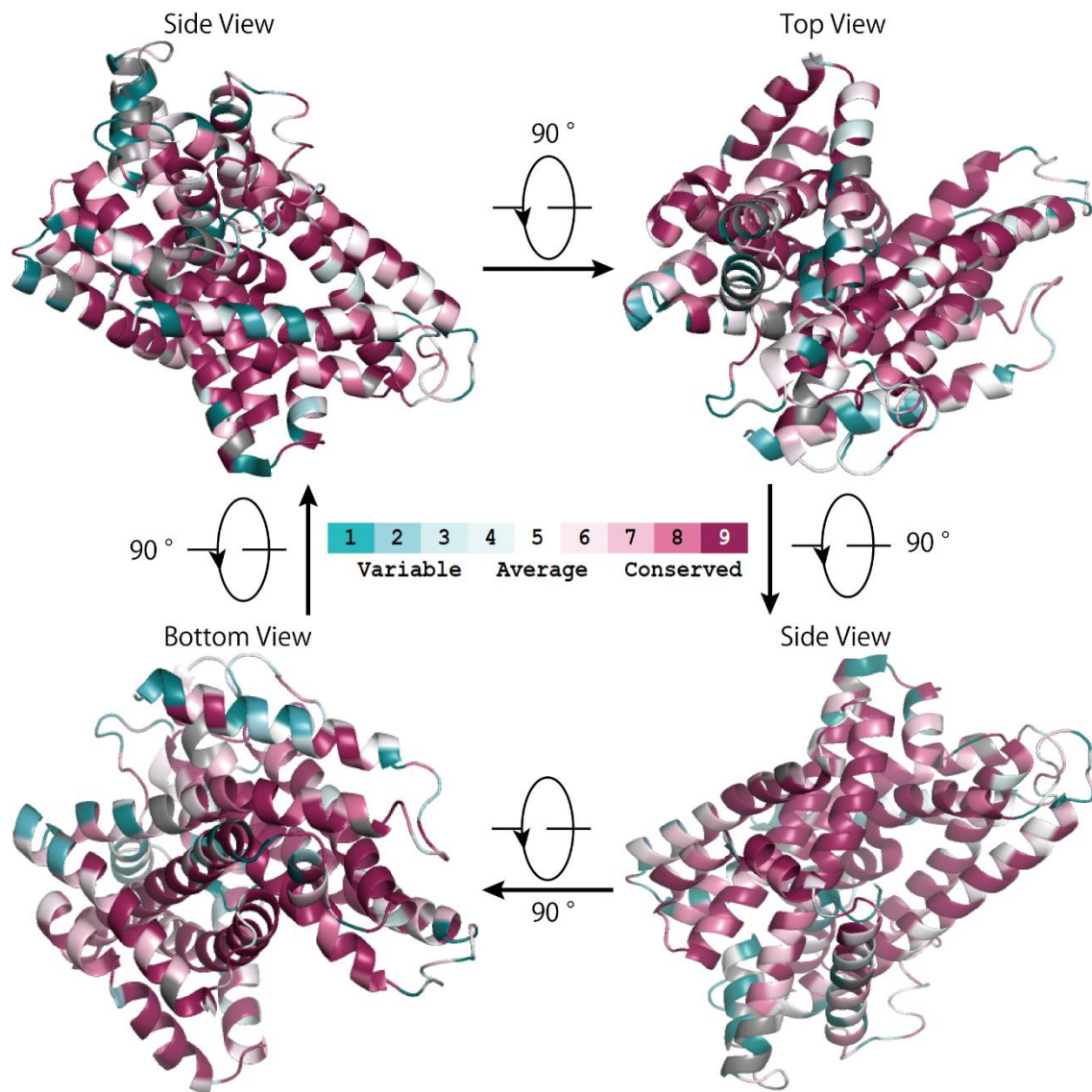


図 2-18. DMT-1 を持つ生物の DMT の進化的保存性。4 方向からの視野で表示した。色が青いほど保存性が低く、赤い程保存性が高い。

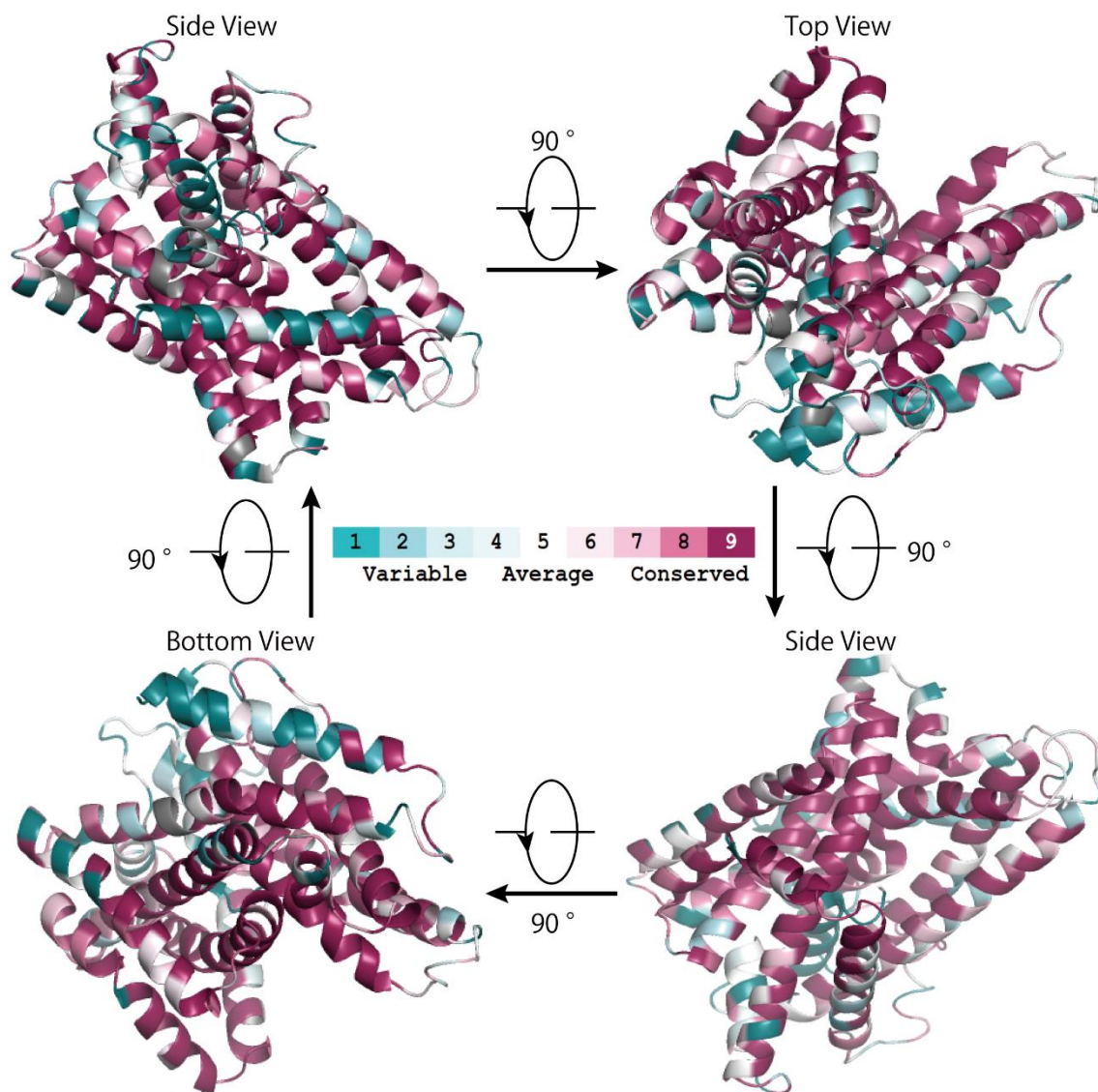


図 2-19. DMTRP を持つ生物の DMT-2 の進化的保存性。4 方向からの視野で表示した。色が青いほど保存性が低く、赤い程保存性が高い。

表 2-1. 使用したプライマー一覧

登場章	プライマー名	配列
2-2-1-4.	ApDMT-5UTR	AGACTGAGAATTGATTATAGCCTTG
2-2-1-4.	ApDMT-3UTR	GAGTAATGCTACCCGCCATC
2-2-1-4.	ApRP-5UTR	GGAGCGAGATAACCCAGCTA
2-2-1-4.	ApRP-3UTR	ACACACACGGACAGGGTTTT
2-2-1-5.	M13-RV	CAGGAAACAGCTATGAC
2-2-1-5.	M13-M4	GTTTTCCAGTCACGAC

表 2-2. 進化的保存性の解析に用いた配列 (DMT-1)

OTU	accession number
<i>Acanthaster planci</i> 1 (COTS)	LC585430
<i>Amphimedon queenslandica</i> 1 (sponge)	XP_019849504.1
<i>Anneissia japonica</i> 1 (feather-stars)	XP_033099615.1
<i>Asterias rubens</i> 1 (starfish)	XP_033624792.1
<i>Bathymodiolus septemdierum</i>	自分で単離したためaccession numberなし
<i>Branchiostoma belcheri</i> 1 (lancelet)	XP_019630054.1
<i>Crassostrea gigas</i> 1 (oyster)	NP_001292237.1
<i>Lingula anatina</i> 1	XP_013422215.1
<i>Lottia gigantea</i> 1 (owl limpet)	XP_009062480.1
<i>Mytilus coruscus</i> 1 (hard-shelled mussel)	CAC5399995.1
<i>Octopus bimaculoides</i> 1 (octopus)	XP_014772339.1
<i>Perna viridis</i> 2 (Asian green mussel)	LC585431
<i>Strongylocentrotus purpuratus</i> 1 (sea urchin)	XP_030828658.1

表 2-3. 進化的保存性の解析に用いた配列 (DMT-2)

OTU	accession number
<i>Acanthaster planci</i> 2 (COTS)	LC585429
<i>Amphimedon queenslandica</i> 2 (sponge)	XP_003387357.3
<i>Anneissia japonica</i> 2 (feather-stars)	XP_033111125.1
<i>Asterias rubens</i> 2 (starfish)	XP_033639560.1
<i>Bathymodiolus septemdierum</i>	自分で単離したためaccession numberなし
<i>Branchiostoma belcheri</i> 2 (lancelet)	XP_019630554.1
<i>Crassostrea gigas</i> 2 (oyster)	XP_034309677.1
<i>Lingula anatina</i> 2	XP_013399116.1
<i>Lottia gigantea</i> 2 (owl limpet)	XP_009052584.1
<i>Mytilus coruscus</i> 2 (hard-shelled mussel)	CAC5382606.1
<i>Octopus bimaculoides</i> 2 (octopus)	XP_014767972.1
<i>Perna viridis</i> 1 (Asian green mussel)	LC585432
<i>Strongylocentrotus purpuratus</i> 2 (sea urchin)	XP_030845937.1

表 2-4. ApDMT, ApDMT-2, ブドウ球菌 *Staphylococcus capitis* DMT (ScaDMT) および放射線抵抗細菌 *Deinococcus radiodurans* の NRAMP ファミリーに属する金属輸送体である MntH (DraNramp) との相同性。相同性はアミノ酸配列を用いて計算した。

	DraNramp	ScaDMT
ApDMT-1	32.56%	37.47%
ApDMT-2	31.65%	36.32%

第三章

DMT 様配列の分子系統解析

3-1. 序論

第二章において、オニヒトデから二種類の DMT 様遺伝子 DMT-1 および DMT-2 を検出した。これは第一章において貝類から単離した二種類の DMT 様配列と同じく、既知のヒトやラット DMT と同様に 12 回膜貫通型であり、また intron の位置、consensus transport motif やその立体構造などが共通してよく保存されていた。このことより、両者は共通祖先に由来する、類似した機能をもつタンパク質である可能性が示唆された。しかしシンテニー解析の結果、周辺遺伝子の保存性は低く、両者は分岐してからかなり長い時間が経過している可能性が考えられた。

DMT は、バクテリアからヒトまで、多くの生物において保存が確認されている遺伝子である (Cellier et al., 1995)。一方で、第一章や第二章において明らかとなったように、異なる染色体上、あるいは離れた距離において保存されていることが確認された複数の DMT 様配列はこれまでに報告がない。そこで本章において、両者の関係やその起源、進化の歴史を明らかにすることを目的に、分子系統解析を試みた。

3-2. 材料と方法

3-2-1. 微生物・植物・動物を網羅する分子系統解析

第二章において取得した ApDMT1 及び ApDMT2 の塩基配列をクエリーとし、文献あるいは NCBI (National Center for Biotechnology Information, アメリカ国立生物工学情報センター) の non-redundant protein sequences (nr) を用いた全ゲノムデータベースにおいて、BLAST 検索により類似した配列を収集した。加えて、Ensembl (https://www.ensembl.org/Eptatretus_burgeri/Info/Index?db=core) において、スタウナギにおける類似配列も取得した。シチヨウシンカイヒバリガイとミドリイガイは極めて配列が近いこと、最近高精度なゲノムが読まれたミドリイガイ (*Perna viridis*) を分子系統樹に採用した。ミドリイガイの配列は Inoue et al. (2021) より取得し、また、Nramp ファミリーに属する Nramp1 の配列は NCBI データベースより、遺伝子名で検索して取得した。類似性は $1.0E-100$ をカットオフ値とし、系統樹作成によりトランスクリプトバリエーションであると判断した配列は除外した。解析に用いた配列のリストを表 3-1 に示す。

分子系統樹はアミノ酸配列を用いて構築した。得られた配列を MAFFT version 7 (Katoh et al., 2018, Katoh & Standley, 2013) を用いてアラインメントし、trimAL v1.2 (<http://trimal.cgenomics.org/>) (Capella-Gutiérrez et al., 2009) の strictplus program を用いてアラインメント困難な領域の自動削除を行った。RAxML version 7.2.6 (<http://www.kramer.in.tum.de/exelixis/software.html>) (Stamatakis, 2006) の

PROTCATWAG model により、ブートストラップ解析を 1000 回行い、最尤法による系統樹を作成した。

3-2-2. 動物 DMT 様配列における分子系統解析

3-2-1.において作成した系統樹より、後生動物 35 種から得られた配列のみを用いて同様の設定において最尤法により系統樹を作成した。動物に最も近い単細胞生物であると考えられており (King et al., 2008)、また、3-2-1.で作成した系統樹においても最も後生動物の先祖の近くに位置した襟鞭毛虫 (*Monosiga brevicollis*) の DMT を外群に設定した。

3-3. 結果

3-3-1. 微生物・植物・動物を網羅する分子系統解析

3-2-1.において DMT 様配列探索を行った結果、バクテリアからヒトまで 48 の生物から 78 の配列を取得することに成功した。配列のリストを表 3-2 に示す。これら配列を用いて作成した最尤法による系統樹を図 3-1 に示す。バクテリアから取得した DMT 様配列は単一のクレードを形成した。植物及びアメーバから得られた配列はそれぞれ二つのクレードに分かれ (アメーバの一方は一つの配列のみであるが、クレードと表記する)、うち一方はバクテリアのクレード近傍に位置していた。興味深いことに、アメーバ *Dictyostelium discoideum* の配列に関しては、バクテリアに近い位置にある *Dictyostelium discoideum* AX4 1 はイントロンのない遺伝子である一方、*Dictyostelium discoideum* AX4 2 (Gene ID: 8619995) にはイントロンが存在した。

全ての後生動物から得られた配列は、後生動物に最も近縁であると考えられている襟鞭毛虫 (King et al., 2008) の配列の近くで単一のクレードを形成した。しかし、後生動物の DMT クレード内の配列間の関係が十分に解けきっておらず、従って分岐の予測は困難であった。これは解析に用いた DMT 様配列の由来が、バクテリア・菌類・植物など広範なために変異が著しく、アラインメントに用いることのできる領域が限定的となってしまうためであると考えられた。そこで、解析に用いる配列を 32 の後生動物の配列に限定し、襟鞭毛虫を外群として、更なる分子系統解析を試みた。

3-3-2. 動物 DMT 様配列における分子系統解析

後生動物の DMT 様配列は、それぞれ ApDMT-1 と ApDMT-2 を含む二つのクレードに分かれた (図 3-2)。後生動物の中でもっとも原始的と考えられる海綿動物からもふたつの DMT 様配列が検出され、それぞれのクレードにひとつずつ含まれた。また、両クレードとも前口

動物、後口動物の配列を含んでいた。このため、ApDMT-1 を含むクレードと ApDMT-2 を含むクレードは後生動物の発生後、海綿動物の分化前に分岐したことが明らかとなった。ヒトやラットなど、全ての既知の DMT 様配列は一つのクレード内にまとまっており、このクレードには ApDMT-2 が含まれていた。このため、ApDMT-2 は既知の DMT のオルソログであると考えられた。以下 ApDMT-2 を ApDMT、その他同クレードに属する DMT 様配列を DMT と呼ぶ。四肢動物においては、二つの DMT が知られており、それらは Nramp1 と Nramp2 と呼ばれているが、両者はどちらもこの DMT クレードの中に含まれ、分岐パターンから見て、脊椎動物の発生後に生じたものであると考えられた。

もう一方のクレードは ApDMT-1 と、過去に報告されていない配列で構成されていた。すなわち、このクレードに含まれる DMT 様タンパク質は、これまで報告のない新規のタンパク質と考えられた。そこで、本タンパク質を DMT-Related Protein (DMTRP) と命名した。DMTRP を持つ生物、カイメン・軟体動物・棘皮動物・ナメクジウオは全て DMT も同時に保持していた。さらに、DMTRP を持つ種は、全て海産動物であった。DMTRP は、淡水や陸上において最も繁栄している生物群である脊椎動物・昆虫・線形動物からは検出されなかった。DMTRP は、同じ腹足綱であっても、海水産腹足綱であるカサガイからは検出されたにもかかわらず、淡水産腹足綱である淡水産ヒラマキガイ及びスクミリンゴカイからは検出されなかった。

3-4. 考察

本章では、オニヒトデから単離した二つの DMT 様配列 ApDMT-1、ApDMT-2 をクエリとしてデータベースから収集した配列を用いて、分子系統解析を行った。

まず、微生物・植物・動物を広く網羅する解析を行ったところ（図 3-1）、後生動物の配列とバクテリアの配列はそれぞれ単一のクレードを形成したが、植物とアメーバの配列は二つずつのクレードを形成した。アメーバの配列については、一方のクレードがバクテリアのクレードの近傍に位置し、しかもイントロンがない遺伝子であったことから、このクレードの属する配列は、遺伝子の水平伝播によって生じたものであると考えられた (Richer et al., 2003)。植物においても、バクテリアに近い方の遺伝子は水平伝播により生じた可能性があるが、双方ともイントロンを持つ遺伝子であったため、その由来を特定することはできなかった。

一方、後生動物の配列は一つのクレードにまとまったものの、微生物や植物を含めた分子系統解析では、その配列の多様性からアラインメントできる領域が少なくなってしまうため、クレード内の系統関係を明らかにすることができなかった。そこで、後生動物由来の

DMT 様配列のみを用い、動物細胞に最も近縁な単細胞生物であると考えられている襟鞭毛虫を外群として分子系統解析を行った結果（図 3-2）、動物の DMT 様配列は大きく二つのクレードに分かれることがわかった。ヒトやラットなどの既知の DMT はすべて片方のクレードにまとまったため、同クレードに属する配列は既知 DMT のオルソログであると考えられた。オニヒトデの ApDMT-2 もこのクレードに含まれたため、同配列をオニヒトデ DMT であると断定した。このクレードの中に、DMT と同じファミリーに属する脊椎動物の Nramp1 と、DMT のシノニムである Nramp2 は両方含まれており、その分岐パターンからは、脊椎動物の分岐後に重複により生じたことが示唆された。Nramp1 は四肢動物からしか報告がない、免疫に関与するタンパク質であるが、本研究の分子系統解析の結果（図 3-2）は、脊椎動物の分化後早い時期に両者が重複したことにより生じ、その後条鰭類魚類から Nramp1 が消失した可能性を示している。この仮説は、魚類は複数の DMT 様配列を持っているが、これらは 3R によって生じ、3R 以前に獲得していた Nramp1 を消失した、という過去の報告（Neves et al., 2011）とも一致している。

一方、もう一つのクレードはヒトデの ApDMT-1 と未知の DMT 様配列で構成されていた。そのため、本クレードに属する配列を新規タンパク質であると判断し、DMT に関連するなんらかのタンパク質であるとして、DMT-related protein, DMTRP と命名した。カイメンも、DMTRP を持つことから、DMTRP は後生動物のかなり早い段階の祖先動物において生じたと考えられた。

しかし、DMT は今回解析に用いた全ての生物から検出されたにも関わらず、DMTRP を保持している生物は海産動物に限定された。また、DMTRP を保持している生物は、必ず同時に DMT も保持していた。このことから、DMT は生存に必須のタンパク質であり、一方 DMTRP は海洋環境への適応に関わるタンパク質である可能性が考えられた。しかし、DMTRP を検出したシチヨウシンカイヒバリガイやマガキと同じ二枚貝類であるホタテガイからも二つの DMT 様配列を取得したが、これらは二つとも DMT クレードに属していた。したがって、データベースが不完全である可能性は残るものの、ホタテガイは DMTRP を欠いている可能性が高い。ちなみに、ホタテガイ DMT のゲノム上の位置を調べると（図考-2）、二つの DMT 様配列はタンデムにゲノム上に位置していた。豊原ら（Toyohara et al., 2005）は、このうちの片方であるホタテガイ DMT は他の生物では輸送が確認されていない、カルシウムイオンの輸送を行っていることを電気生理学的アプローチによって示唆している。ホタテガイのみならず、海産種の存在する甲殻類や線虫、脊椎動物からは DMTRP が一切検出されなかったことより、海産動物の全てが DMTRP を保持しているわけではなく、DMTRP は海で生存するために必須のタンパク質ではなさそうである。一方、軟体動物の腹足綱であ

る海産動物であるカサガイからは **DMTRP** が検出されたが、同じ腹足綱の淡水産ヒラマキガイおよびスクミリンゴカイからは検出されなかったことは、**DMTRP** は淡水や陸上では不必要または持つと不利になるタンパク質である可能性がある。

以上のことより、**DMT** と **DMTRP** は異なる機能を持ち、そのために両者を保持することが海洋環境適応に有利である、あるいは淡水もしくは陸上適応において必要でない可能性が考えられた。そこで次章において **ApDMT** と **ApDMTRP** の機能解析を行い、両者が海洋環境適応に果たす役割を明らかにすることを試みた。

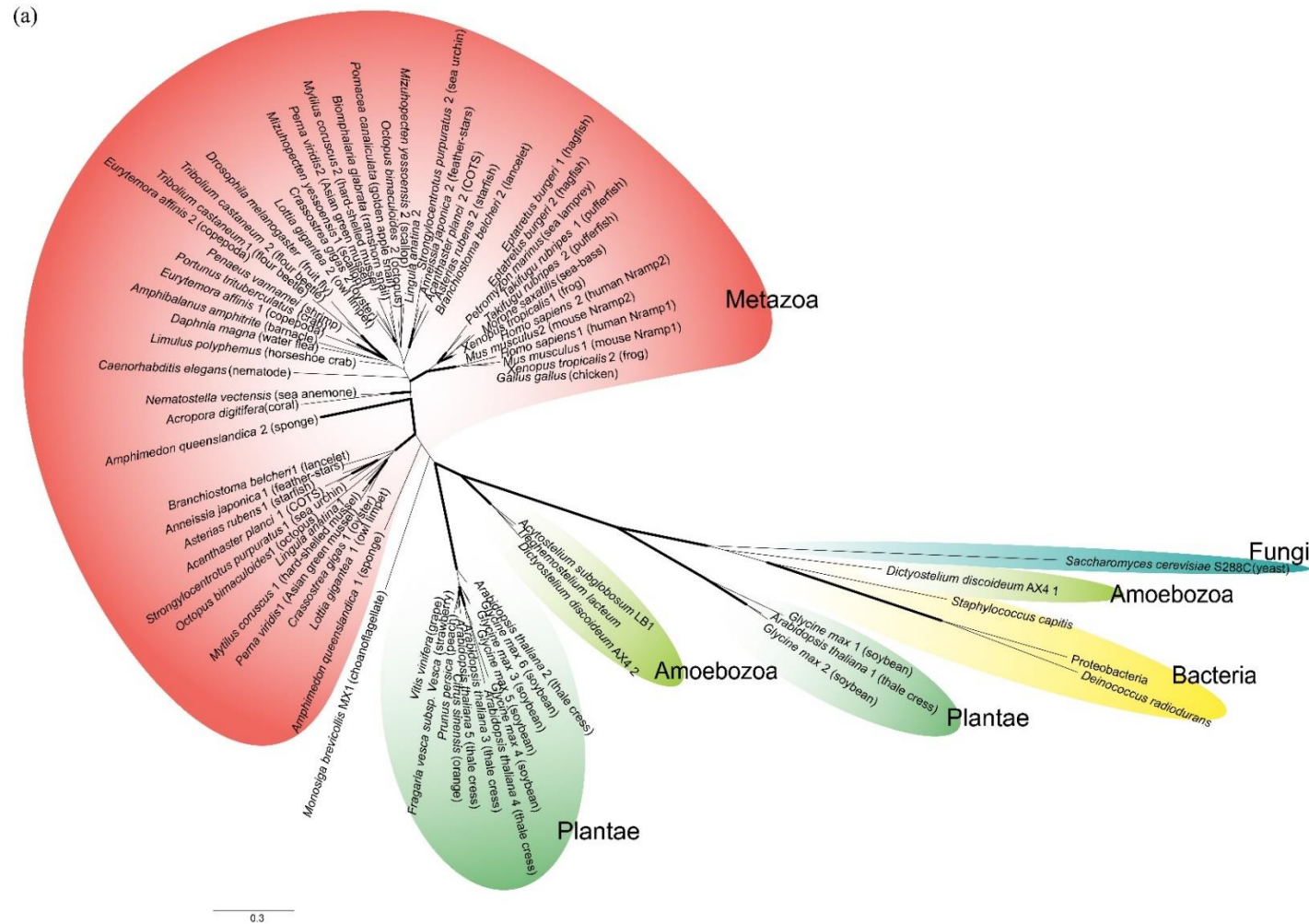


図 3-1. 細菌、植物、動物等広く生物から取得した DMT 様配列を用いた分子系統解析の結果。最尤法で構築し、無根系統樹として示した。スケールバーは、1 座位あたり 0.3 置換の系統的距離を示している。解析に使用したのは 300 アミノ酸残基である。

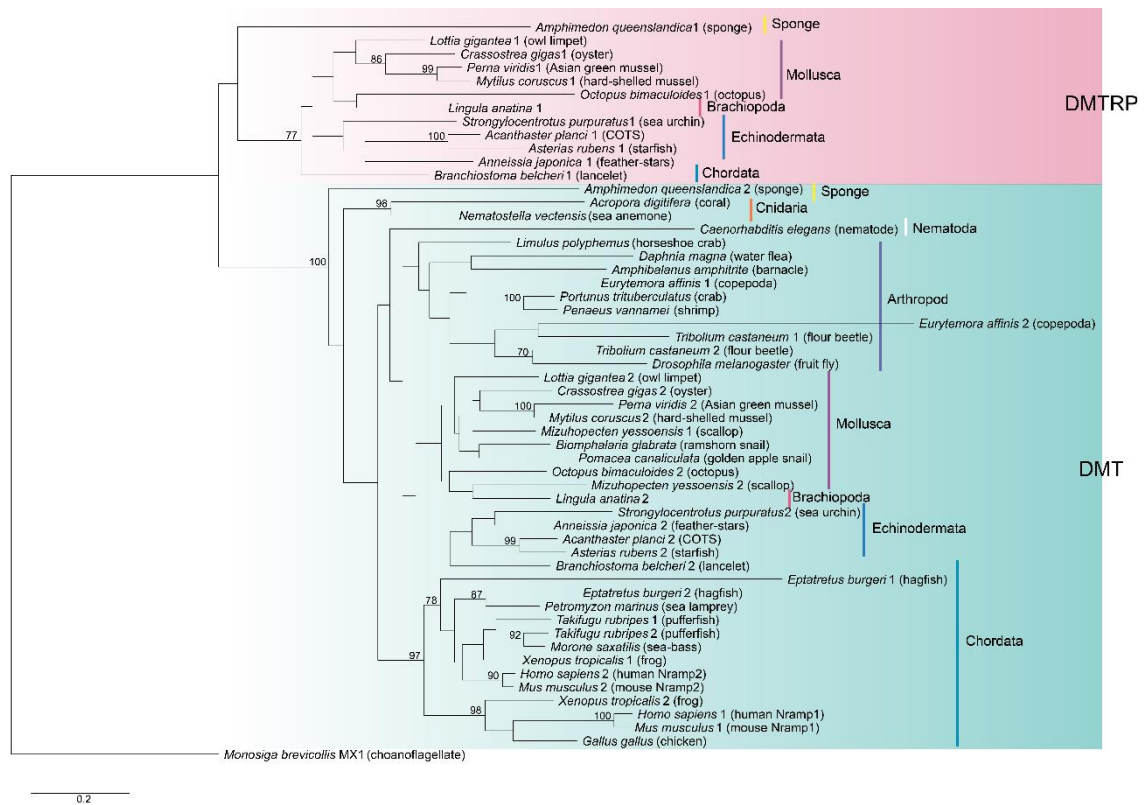


図 3-2.後生動物 DMT 様配列を用いて構築した分子系統解析の結果。襟鞭毛虫を外群に用い、最尤法で分子系統解析を行った。スケールバーは、1 座位あたり 0.2 置換の系統的距離を示している。解析に使用したのは 361 アミノ酸残基である。

表 3-1. 分子系統解析に用いた配列一覧

OTU	accession number
<i>Acanthaster planci</i> 1 (COTS)	LC585430
<i>Acanthaster planci</i> 2 (COTS)	LC585429
<i>Acropora digitifera</i> (coral)	XP 015750918.1
<i>Acytostelium subglobosum</i> LB1	XP 012750903.1
<i>Amphibalanus amphitrite</i> (barnacle)	KAF0312761.1
<i>Amphimedon queenslandica</i> 1 (sponge)	XP 019849504.1
<i>Amphimedon queenslandica</i> 2 (sponge)	XP 003387357.3
<i>Anneissia japonica</i> 1 (feather-stars)	XP 033099615.1
<i>Anneissia japonica</i> 2 (feather-stars)	XP 033111125.1
<i>Arabidopsis thaliana</i> 1 (thale cress)	NP 173048.3
<i>Arabidopsis thaliana</i> 2 (thale cress)	NP 201534.1
<i>Arabidopsis thaliana</i> 3 (thale cress)	NP 175157.1
<i>Arabidopsis thaliana</i> 4 (thale cress)	NP 193614.1
<i>Arabidopsis thaliana</i> 5 (thale cress)	NP 179896.1
<i>Asterias rubens</i> 1 (starfish)	XP 033624792.1
<i>Asterias rubens</i> 2 (starfish)	XP 033639560.1
<i>Biomphalaria glabrata</i> (ramshorn snail)	XP 013085222.1
<i>Branchiostoma belcheri</i> 1 (lancelet)	XP 019630054.1
<i>Branchiostoma belcheri</i> 2 (lancelet)	XP 019630554.1
<i>Caenorhabditis elegans</i> (nematode)	NP 500235.4
<i>Citrus sinensis</i> (orange)	XP 006466526.1
<i>Crassostrea gigas</i> 1 (oyster)	NP 001292237.1
<i>Crassostrea gigas</i> 2 (oyster)	XP 034309677.1
<i>Daphnia magna</i> (water flea)	XP 032787957.1
<i>Deinococcus radiodurans</i>	WP 010888344.1
<i>Dictyostelium discoideum</i> AX4 1	XP 643409.1
<i>Dictyostelium discoideum</i> AX4 2	XP 642974.1
<i>Drosophila melanogaster</i> (fruit fly)	NP 524425.2
<i>Eptatretus burgeri</i> 1 (hagfish)	Eburgeri 3.2 (GCA 900186335.2)ENSEBUT00000002648.1
<i>Eptatretus burgeri</i> 2 (hagfish)	Eburgeri 3.2 (GCA 900186335.2)ENSEBUT00000013657.1
<i>Eurytemora affinis</i> 1 (copepoda)	XP 023332486.1
<i>Eurytemora affinis</i> 2 (copepoda)	XP 023340078.1
<i>Fragaria vesca</i> subsp. <i>Vesca</i> (strawberry)	XP 004287980.1
<i>Gallus gallus</i> (chicken)	NP 990295.1
<i>Glycine max</i> 1 (soybean)	XP 003526645.1
<i>Glycine max</i> 2 (soybean)	XP 003530275.1
<i>Glycine max</i> 3 (soybean)	NP 001344702.1
<i>Glycine max</i> 4 (soybean)	XP 003529902.1
<i>Glycine max</i> 5 (soybean)	NP 001344708.1
<i>Glycine max</i> 6 (soybean)	NM 001249798.2
<i>Homo sapiens</i> 1 (human Nramp1)	NP 000569.3
<i>Homo sapiens</i> 2 (human Nramp2)	BAA24933.1
<i>Limulus polyphemus</i> (horseshoe crab)	XP 022248482.1
<i>Lingula anatina</i> 1	XP 013422215.1
<i>Lingula anatina</i> 2	XP 013399116.1
<i>Lottia gigantea</i> 1 (owl limpet)	XP 009062480.1
<i>Lottia gigantea</i> 2 (owl limpet)	XP 009052584.1
<i>Mizuhopecten yessoensis</i> 1 (scallop)	XP 021376430.1
<i>Mizuhopecten yessoensis</i> 2 (scallop)	BAD99106.1
<i>Monosiga brevicollis</i> MX1 (choanoflagellate)	XP 001742336.1
<i>Morone saxatilis</i> (sea-bass)	AAG31225.2
<i>Mus musculus</i> 1 (mouse Nramp1)	NP 038640.2
<i>Mus musculus</i> 2 (mouse Nramp2)	NP 032758.2
<i>Mytilus coruscus</i> 1 (hard-shelled mussel)	CAC5399995.1
<i>Mytilus coruscus</i> 2 (hard-shelled mussel)	CAC5382606.1
<i>Nematostella vectensis</i> (sea anemone)	XP 001635621.1
<i>Octopus bimaculoides</i> 1 (octopus)	XP 014772339.1
<i>Octopus bimaculoides</i> 2 (octopus)	XP 014767972.1
<i>Penaeus vannamei</i> (shrimp)	XP 027217745.1
<i>Perna viridis</i> 1 (Asian green mussel)	LC585432
<i>Perna viridis</i> 2 (Asian green mussel)	LC585431
<i>Petromyzon marinus</i> (sea lamprey)	XP 032801752.1
<i>Pomacea canaliculata</i> (golden apple snail)	XP 025093172.1
<i>Portunus trituberculatus</i> (crab)	MPC12316.1
Proteobacteria	WP 000186369.1
<i>Prunus persica</i> (peach)	XP 007205063.1
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> S288C (yeast)	NP 014519.1
<i>Staphylococcus capitis</i>	WP 107396307.1
<i>Strongylocentrotus purpuratus</i> 1 (sea urchin)	XP 030828658.1
<i>Strongylocentrotus purpuratus</i> 2 (sea urchin)	XP 030845937.1
<i>Takifugu rubripes</i> 1 (pufferfish)	XP 029690273.1
<i>Takifugu rubripes</i> 2 (pufferfish)	CAD4305.1
<i>Tieghemostelium lacteum</i>	KYQ91884.1
<i>Tribolium castaneum</i> 1 (flour beetle)	XP 973779.1
<i>Tribolium castaneum</i> 2 (flour beetle)	XP 967521.1
<i>Vitis vinifera</i> (grape)	XP 002283902.1
<i>Xenopus tropicalis</i> 1 (frog)	NP 001116938.1
<i>Xenopus tropicalis</i> 2 (frog)	XP 002933999.2

表 3-2. 有根分子系統解析に用いた配列一覧

OTU	accession number
<i>Acanthaster planci</i> 1 (COTS)	LC585430
<i>Acanthaster planci</i> 2 (COTS)	LC585429
<i>Acropora digitifera</i> (coral)	XP_015750918.1
<i>Amphibalanus amphitrite</i> (barnacle)	KAF0312761.1
<i>Amphimedon queenslandica</i> 1 (sponge)	XP_019849504.1
<i>Amphimedon queenslandica</i> 2 (sponge)	XP_003387357.3
<i>Ammeissia japonica</i> 1 (feather-stars)	XP_033099615.1
<i>Ammeissia japonica</i> 2 (feather-stars)	XP_033111125.1
<i>Asterias rubens</i> 1 (starfish)	XP_033624792.1
<i>Asterias rubens</i> 2 (starfish)	XP_033639560.1
<i>Biomphalaria glabrata</i> (ramshorn snail)	XP_013085222.1
<i>Branchiostoma belcheri</i> 1 (lancelet)	XP_019630054.1
<i>Branchiostoma belcheri</i> 2 (lancelet)	XP_019630554.1
<i>Caenorhabditis elegans</i> (nematode)	NP_500235.4
<i>Crassostrea gigas</i> 1 (oyster)	NP_001292237.1
<i>Crassostrea gigas</i> 2 (oyster)	XP_034309677.1
<i>Daphnia magna</i> (water flea)	XP_032787957.1
<i>Drosophila melanogaster</i> (fruit fly)	NP_524425.2
<i>Eptatretus burgeri</i> 1 (hagfish)	Eburgeri_3.2 (GCA_900186335.2)ENSEBUT00000002648.1
<i>Eptatretus burgeri</i> 2 (hagfish)	Eburgeri_3.2 (GCA_900186335.2)ENSEBUT00000013657.1
<i>Eurytemora affinis</i> 1 (copepoda)	XP_023332486.1
<i>Eurytemora affinis</i> 2 (copepoda)	XP_023340078.1
<i>Gallus gallus</i> (chicken)	NP_990295.1
<i>Homo sapiens</i> 1 (human Nramp1)	NP_000569.3
<i>Homo sapiens</i> 2 (human Nramp2)	BAA24933.1
<i>Limulus polyphemus</i> (horseshoe crab)	XP_022248482.1
<i>Lingula anatina</i> 1	XP_013422215.1
<i>Lingula anatina</i> 2	XP_013399116.1
<i>Lottia gigantea</i> 1 (owl limpet)	XP_009062480.1
<i>Lottia gigantea</i> 2 (owl limpet)	XP_009052584.1
<i>Mizuhopecten yessoensis</i> 1 (scallop)	XP_021376430.1
<i>Mizuhopecten yessoensis</i> 2 (scallop)	BAD99106.1
<i>Monosiga brevicollis</i> MX1 (choanoflagellate)	XP_001742336.1
<i>Morone saxatilis</i> (sea-bass)	AAG31225.2
<i>Mus musculus</i> 1 (mouse Nramp1)	NP_038640.2
<i>Mus musculus</i> 2 (mouse Nramp2)	NP_032758.2
<i>Mytilus coruscus</i> 1 (hard-shelled mussel)	CAC5399995.1
<i>Mytilus coruscus</i> 2 (hard-shelled mussel)	CAC5382606.1
<i>Nematostella vectensis</i> (sea anemone)	XP_001635621.1
<i>Octopus bimaculoides</i> 1 (octopus)	XP_014772339.1
<i>Octopus bimaculoides</i> 2 (octopus)	XP_014767972.1
<i>Penaeus vannamei</i> (shrimp)	XP_027217745.1
<i>Perna viridis</i> 1 (Asian green mussel)	LC585432
<i>Perna viridis</i> 2 (Asian green mussel)	LC585431
<i>Petromyzon marinus</i> (sea lamprey)	XP_032801752.1
<i>Pomacea canaliculata</i> (golden apple snail)	XP_025093172.1
<i>Portunus trituberculatus</i> (crab)	MPC12316.1
<i>Strongylocentrotus purpuratus</i> 1 (sea urchin)	XP_030828658.1
<i>Strongylocentrotus purpuratus</i> 2 (sea urchin)	XP_030845937.1
<i>Takifugu rubripes</i> 1 (pufferfish)	XP_029690273.1
<i>Takifugu rubripes</i> 2 (pufferfish)	CAD43051.1
<i>Tribolium castaneum</i> 1 (flour beetle)	XP_973779.1
<i>Tribolium castaneum</i> 2 (flour beetle)	XP_967521.1
<i>Xenopus tropicalis</i> 1 (frog)	NP_001116938.1
<i>Xenopus tropicalis</i> 2 (frog)	XP_002933999.2

第四章

機能解析

4-1. 序論

前章までに、オニヒトデからふたつの DMT 様遺伝子を発見し、一方は既知の DMT と相同な遺伝子、もう一方はこれまで報告がない新規遺伝子であることを明らかにし、それぞれがコードするタンパク質を DMT (ApDMT) および DMTRP (ApDMTRP) と命名した。第 2 章で行った構造比較において、DMT と DMTRP は、膜貫通部位やドメインの配置、予測される立体構造等は保存されており、類似の機能を持つことが予測されている。一方、第 3 章で実施した分子系統解析の結果から、DMT 遺伝子と DMTRP 遺伝子が後生動物の進化の初期に重複により生じたもので、DMT は動物全体に保持されているが、DMTRP は海産動物でのみ保持されていることがわかった。したがって、両者は異なる機能を持つ可能性が示唆された。

本章では、オニヒトデの DMT および DMTRP の機能解析を、アフリカツメガエル卵母細胞及び組換え酵母発現系を用いて行った。なお、アフリカツメガエル卵母細胞を用いた電気生理学的実験については、第 1 章で単離したシチヨウシンカイヒバリガイ DMT (BsDMT) およびマガキ DMTRP (CgDMTRP) についても実施したので、合わせて記述する。

アフリカツメガエル卵母細胞を用いた電気生理学的機能解析

アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) 卵母細胞は、その直径が 1 mm 以上あることからマイクロインジェクションに適しており、異種発現のモデルとして数多くの実験に使用されている。マイクロインジェクションにより卵母細胞上で cDNA を発現させることにより、細胞膜輸送やシグナル伝達といったタンパク質の機能を研究する上で重要な手法として知られている (Marchant, 2018)。アフリカツメガエル卵母細胞を用いた二電極電圧クランプ法 (two-electrode voltage-clamp : TEVC) は、アフリカツメガエル卵母細胞がその細胞膜上に内因性のチャネルや受容体の発現が少ないため、イオンチャネルや受容体等に対する分子生物学的アプローチを行う上で利便性の高い発現系として、広く用いられている (Guan et al., 2013)。TEVC 法は、膜電圧を電圧電極で測定し、もう一つの電極で卵母細胞に電流を流すことで、膜電位をクランプし、イオンチャネルの開閉による膜電流の変化を測定する手法である (Dascal, 2000)。

組換え酵母発現系による機能解析

出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) を用いる組換え発現系も、遺伝子がコードするタンパク質の機能を調べるためによく使われる実験系である。酵母は真核生物であるが、遺伝子操作実験が比較的容易であり、しかも細菌とは異なり翻訳語修飾も行うことができるため、真核生物の遺伝子の機能解析に適している。哺乳類細胞培養による発現系と比較しても、酵母による発現系は迅速かつ低コストである (Nielsen, 2014)。本研究では、組換え酵母を用いて二通りの方法で機能解析を試みた。ひとつはスポットアッセイで、組換え酵母を段階

的に希釈しながら金属を含んだ寒天培地上にスポットし、コロニーの形成の度合いから増殖活性を比較した。もうひとつは組換え酵母を金属を含む培地中で培養し、曝露後に菌体内の金属量を ICP-MS (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry) により測定することで、取り込み活性を比較した。

4-2. 材料と方法

4-2-1. 電気生理学的解析

4-2-1-1. コンストラクトの作成

BsDMT, CgDMTRP, ApDMT, ApDMTRP 及び EGFP の cDNA を鋳型として、BsDMT については kozakBsDMT および BsDMT-scdn を、CgDMTRP については kozakCgRP および CgRP-scdn, ApDMT については KozakApDMT および ApDMT3、ApDMTRP については KozakApRP および Ap3RP、EGFP に関しては pNHK-F および pNHK-R をプライマーに用いた PCR により、Kozak 配列を付加した (表 4-1)。PCR には KOD-plus-DNA ポリメラーゼを使用し、反応液は添付のプロトコールに従って調製した。サーマルサイクラー条件は、94°C で 2 分間の初期変性を行った後、94°C で 15 秒の変性、下記温度で 30 秒のアニーリング、68°C で 2 分 30 秒の伸長反応を 35 サイクル行い、72°C で 7 分間の最終延長を行った。アニーリング温度は以下の通りである。BsDMT については最初のサイクルで 75°C で 5 サイクル、続いて 70°C で 5 サイクル、65°C で 25 サイクルまで低下させた。CgDMTRP については最初のサイクルで 75°C で 5 サイクル、続いて 70°C で 5 サイクル、65°C で 5 サイクル、60°C で 20 サイクルまで低下させた。ApDMT および ApDMTRP は最初のサイクルで 70°C とし、35 サイクル以内に 60°C まで徐々に低下させた (タッチダウン PCR)。EGFP に関しては 94°C 15 秒の熱変性の後、アニーリングと伸長反応を 68°C 1 分というセットを 35 サイクル行った (シヤトル PCR)。増幅されたフラグメントを精製した DNA 断片は、TA-cloning 法により、DNA Ligation Kit <Mighty Mix> (Takara Bio Inc.) を用いて pGEM-T Easy ベクター (Promega) に組み込んだ。研究室において ECOSTM Competent *E. coli* XL1-Blue (Nippon Gene CO.) より作成したコンピテントセルを用いた形質転換を行った後、LB 培地上で 37°C で一晩培養した。培養後、T7 と SP6 プライマーを用いて、コロニーダイレクト PCR を行った。この PCR は、AmpliTaq Gold PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Inc.) DNA ポリメラーゼを用いて、添付のプロトコールに従って反応液を調製した。反応条件は、95°C で 5 分間熱変性を行った後、95°C で 15 秒の熱変性・55°C で 15 秒のアニーリング・72°C で、プロトコールに従い 1,000 bp/1 分を基準とし、ベクターに挿入された配列断片の長さに応じた伸長反応のセットを 27 サイクル行い、その後 72°C で 7 分間伸長反応を行った。PCR 反応後、得られた PCR 産物全量を 1.5% アガロースゲルを用いて電気泳動を行い、増幅および PCR 産物のサイズを確認した。このインサートチェックにより、正しいサイズにおける増幅が確認された形質転換体を、液体 LB 培地 3 mL 中へ植菌し、37°C で一晩振盪培養した。培養産物から QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN) を用いてプラスミドを抽出し、配列確認に用

いる鋳型とした。

配列の確認は、第二章”2-2-1-7. 配列決定”と同じ手法で行った。

これら操作により得られたプラスミドを kozak-BsDMT、kozak-CgDMTRP、kozak-ApDMT、kozak-ApDMTRP および kozak-EGFP と命名した。これらプラスミドを、BsDMT、CgDMTRP および EGFP は Sall-HF (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA, U.S.A) を用いて、ApDMT および ApDMTRP は NotI-HF を用いて制限酵素処理を行い、一本鎖に切断した。この消化産物をフェノール・クロロホルム抽出およびエタノール沈殿により精製し、cRNA 合成の鋳型とした。

4-2-1-2. cRNA 合成

mMESSAGE mMACHINE™ T7 ULTRA Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific, Inc.) を用い、添付のプロトコールに従い cRNA を合成した。作成した cRNA は、RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて、添付のプロトコールに従い精製した。

4-2-1-3. 電気生理実験に用いる溶液の作成

以下に述べる薬品は、特に記載のない限り FUJIFILM Wako Pure Chemical Co. より購入した。MBS stock solution 1 は、NaCl 88.0 mM, KCl 1.0 mM, NaHCO₃ 2.4 mM, 0.82 mM, HEPES 10.0 mM となるように調整し、MBS stock solution 2 は Ca (NO₃)₂ 0.33 mM, CaCl₂ 0.41 mM, MgSO₄ となるように調整し、オートクレーブにより滅菌処理をした後 4℃において保存した。MBS stock solution 1 と MBS stock solution 2 を 1 : 1 で混合した溶液を MBS と称する。Uptake solution は、NaCl 96 mM, KCl 2 mM, MgCl₂ 1.6 mM, ascorbic acid 0.1 mM, HEPES 2.5 mM, MES 2.5 mM となるように調整したのち、1M Tris-base によって pH 7.5 と pH 5.5 に調整し、0.22 μm フィルター滅菌を行った。

この pH 5.5 に調整した uptake solution に、それぞれ CdCl₂, HgCl₂, PbCl₂, ZnCl₂, CuCl₂, FeCl₂ (Merck KGaA) が 0.1 mM となるように添加した。

4-2-1-4. 卵母細胞の単離

メスのアフリカツメガエルを、ゼノパス養殖教材 (茨城県、日本) より購入した。アフリカツメガエルは、3-アミノ安息香酸エチル Ethyl 3-aminobenzoate (Merck KGaA) 及び氷冷により麻酔した。十分に麻酔が効いていることを確認した後、手術により卵母細胞を取り出した。アフリカツメガエルは卵母細胞を取り出した後開腹部を縫合し、麻酔がきれたことを確認した後常温の水に戻した。卵母細胞は取り出した後カルシウムフリーの MBS stock solution 1 中で房を割いて卵母細胞を露出させた。MBS stock solution 1 中に、2 mg/ml となるよう collagenase (Merck KGaA) を溶かし、この溶液中に卵母細胞を入れ、室温で二時間穏やかに混和しながら培養した。卵母細胞がばらばらになったことを確認した後、MBS stock solution1 でリンスし、コラゲナーゼを除去し、その後卵母細胞を MBS 中に移し、次の実験

まで 16°C で保管した。

4-2-1-5. 卵細胞への cRNA の注入

直径 1.5 mm の中芯入りパイレックス管 (Narishige Scientific Instrument Lab., Tokyo, Japan) をマイクロピペットプラー P-97/IVF (Sutter Novato, CA, USA) でひき、極小電極を作成した。作成したガラス電極に cRNA を使用分充填し、マイクロインジェクター (Eppendorf, Hamburg, Germany) に装着した後に電極の先をピンセットを使って折り開口させた。インジェクションする卵母細胞は、①動物極と植物極の境目がはっきりしているもの、②極端に大きすぎず、また小さすぎないもの、③形が歪でないもの、④動物極あるいは植物極にシミのないもの、という条件をより多く満たしたものを選択した (図 4-1、4-2)。その後、選択した卵母細胞内に 25 ng / cell の cRNA 濃度となるように、cRNA 4.0 μ L (もしくは純水 4.0 μ L)、0.04% フェノールレッド (FUJIFILM Wako Pure Chemical Co.) 6.0 μ L、 $\times 10$ PBS (FUJIFILM Wako Pure Chemical Co.) 1.0 μ L の組成でインジェクションを行った。ApDMT および ApDMTRP をインジェクションする際は、インジェクションの成功をより確実に見分けるために、0.04% フェノールレッド 6.0 μ L、 $\times 10$ PBS 1.0 μ L とともに、ApDMT あるいは ApDMTRP が 20 ng/cell、EGFP が 8 ng/cell となるように二つの cRNA を混合してインジェクションした。インジェクションをした卵母細胞はペニシリン-ストレプトマイシン溶液 (FUJIFILM Wako Pure Chemical Co.) を最終濃度 50 unit/mL となるように加えた MBS 溶液中に浸し、16°C で 3 日から 7 日培養し、一日に 1-2 回、溶液を新鮮なものと取り換えた。液替えの際、①中身が飛び出している、あるいは②細胞表面に張りがなくなった卵母細胞は排除した。

4-2-1-6. 2 電極膜電位固定法

直径 1.5 mm の中芯入りパイレックス管をマイクロピペットプラー P-97/IVF でひき、極小電極を作成した。使用の直前に 3 M KCl を電極内に注入し、ピンセットで先端を折り開口させた。状態の良い卵母細胞を灌流層の中に設置し、Ca²⁺ free uptake solution 溶液を Rainin Dynamax RP-1 Peristaltic Pump (Marshall Scientific, NH, USA) を用いて灌流させた。これは、一般的に使用される灌流液中には Ca²⁺が含まれるが、ラット DMT において Ca²⁺によって活性が低下するという報告がされているためである (Gunshin et al., 1997)。その後実体顕微鏡下 (Olympus Co., Tokyo, Japan) で観察しながら、3 次元マイクロマニピュレーター (Narishige Scientific Instrument Lab.) に固定した 2 本の微小電極を卵母細胞に刺入した。不関電極は卵母細胞及び電極に触れない液中に設置した。電極は二本とも微小電極電位固定記録用アンプ OC-725D Oocyte Clamp (Warner Instruments, MA, USA) に接続し、-50 mV で電圧を固定した。電位の変化は、灌流液中に測定対象金属を含む pH7.5 の溶液と、その後同じ組成で pH5.5 の溶液を灌流させることで測定した。

4-2-1-7. データ処理

Clampfit version10.2.0.14 (Molecular Devices、CA、USA) 上において、Lowpass フィルターを用いて Type: Gaussian、-3 dB cutoff (Hz) : 40 にセットし、ノイズを消去した。

4-2-2. 酵母を用いた発現系

酵母を用いた機能解析として、発現局在・スポットアッセイ・金属取込実験を行った。以下に、これら実験において共通して用いた酵母について記述する。

4-2-2-1. 酵母

Saccharomyces cerevisiae strain DY1457、およびその鉄輸送能力欠損変異株 DEY1453 (Dix et al. 1994)、亜鉛輸送能力欠失株 ZHY3、ならびに BY4743 は、David J. Eide 博士および Ihsan Ullah 博士から供与頂いた。Suppressor of Mitochondria import Function (West et al, 1992) として知られる酵母 DMT である SMF1 を欠損している BY4743 の単一変異株 HomDip-YOL122C は、Transomic Technologies (Huntsville, AL, USA) から購入した。これら研究で使用した酵母のリストを表 4-2 に示す。

4-2-2-2. 発現ベクター

酵母発現ベクター pDR195 (Addgene plasmid #36028) は、Addgene (Cambridge, MA, USA.) から購入した。まず、pDR195 を線状化するために、プライマー pPMA5 と ADH3 を用いて、PrimeSTAR® Max DNA Polymerase (Takara Bio Inc.) を用いて PCR を行った。反応液の組成は添付のプロトコールに従った。反応条件は、98℃で 1 分の熱変性の後、98℃で 10 秒の熱変性・55℃で 5 秒のアニーリング・72℃で 6 分 30 秒のステップを 30 サイクル行い、最後に 72℃で 7 分伸長反応を行った。次に ApDMT, ApDMTRP を pDR195 に導入するために、各プラスミドの上流および下流に pDR195 の配列断片を組み込むことを目的とし、2-2-1-1. において作成した kozak-ApDMT と kozak-ApDMTRP を鋳型として、プライマー pDR+ApDMT5 と pDR+ApDMT3 および pDR+ApRP5 と pDR+ApRP3 を用いた PCR を行った。ポリメラーゼは PrimeSTAR® Max DNA Polymerase を用い、反応液の組成は添付のプロトコールに従った。反応条件は、98℃で 1 分の熱変性の後、98℃で 10 秒の熱変性・55℃で 5 秒のアニーリング・72℃で 2 分 30 秒のステップを 30 サイクル行い、最後に 72℃で 7 分伸長反応を行った。こうして得られた PCR 産物に制限酵素 *DpnI* (New England Biolabs Inc.) を加え、37℃で一晩反応させた。得られた産物は電気泳動を行い、Qiaquick (QIAGEN) を用いたゲル抽出により目的のバンドを抽出した。この産物に対し、In-Fusion HD クローニングキット (Takara Bio Inc.) を用いてインサート：ベクター比が 2:1 となるようにライゲーションを行い、ApDMT および ApDMTRP を pDR195 に組み込んだ。構築したベクター ApDMT+DR195 および ApDMTRP+pDR195 を、Frozen - EZ Yeast Transformation II Kit (Zymo Research Co., CA, U.S.A) を用いて、DEY1435 (*fet3fet4*)、ZHY3 (*zrt1zrt2*)、SMF1、DY1453 および BY4743 に導入した。

4-2-2-3. 形質転換

構築したベクターApDMT+DR195 および ApDMTRP+pDR195 を、Frozen - EZ Yeast Transformation II Kit を用いて、DEY1435 (*fet3fet4*)、ZHY3 (*zrt1zrt2*)、SMF1、DY1453 および BY4743 に導入した。形質転換体は、DEY1453 については 10 μ M の FeCl₃ を加えた synthetic defined (SD) -Ura 培地プレート (pH4.0) を用いて、ZHY3 については 10 μ M の FeCl₃ および ZnCl₂ を添加した SD-Ura 培地プレート (pH5.8) を用いて、SMF1 については 100 μ M の MnSO₄ を添加した SD-Ura 培地プレート (pH5.2) を用いて、形質転換された DY1453 および BY4743 については SD-Ura 培地プレートを用いて選択した。

4-2-2-4. 発現局在

細胞内局在性を調べるため、国立バイオリソースプロジェクト (NBRP) から提供された pNHK12 (Nishimura et al., 2009) から、プライマーpDR-EGFP と EGFP-ApRP を用いて EGFP 遺伝子を増幅した。この増幅産物を、プライマーApDMT-EGFP、ApDMTRP-EGFP および EGFP-pDR を用いて、2-2-1-2.において作成した pDR195+ApDMT および pDR195+ApDMTRP の C 末端に、In-Fusion HD クローニングキットを用いて、融合タンパク質をフレーム内で発現させるようにライゲーションした。得られたベクターを、それぞれ pDR195+ApDMT+EGFP および pDR195+ApDMTRP+EGFP と命名した。pDR195+ApDMT+EGFP、pDR195+ApDMTRP+EGFP、および空ベクターpDR195 を、frozen-EZ Yeast transformation II kit を用いて、コンピテントセル DY1457 に導入した。形質転換体を、適切なアミノ酸を含む合成ドロップアウト培地を含むプレート上において培養し、導入されている株を選択した。これらの酵母を、50 mM の 2-モルホリノエタンスルホン酸 50 mM により pH6.0 に調整した SD-Ura 培地 1 mL 中において、30°C で 24 時間インキュベートした。その後、6000 \times g で 5 分間遠心分離することにより酵母を回収した。回収した酵母 (OD₆₀₀ = 0.1) を滅菌水で洗浄し、1 mL の SD-Ura 培地 (pH6.0) で 30°C で一晩培養した。発現した融合タンパク質の観察には、蛍光顕微鏡 (オリンパス BX-53、高圧水銀ランプ、U-HGLGPS、蛍光フィルターキューブ、U-FGFP を搭載、Olympus Co.) を用い、デジタルカメラ DS-Ri1 (Nikon Co., Tokyo, Japan) を用いて画像を撮影した。

4-2-2-5. スポットアッセイ

4-2-2-5-1. 前培養

スポットアッセイは、鉄、銅、マンガンについて実施した。アッセイにはそれぞれの金属の取り込み能が欠損した変異株と、野生型株を用いた。4-2-2-3.において選択した固形培地から取り出したシングルコロニーを、固形培地と同じ組成の液体培地 1 mL 中 (100 μ M の FeCl₃, ZnCl₂, MnSO₄ のいずれかが含まれている) において、OD₆₀₀ が 1.0 になるまで、30°C において振盪培養した。OD₆₀₀ が 1.0 になったことを確認した後、6000 \times g で 5 分間遠心分離して細胞をペレット状にし、滅菌水により洗浄することで金属を除去し、OD₆₀₀ が 0.1 に

なるように調整した。

4-2-2-5-2. 本培養

選択の際に用いたのと同じ液体培地 1 mL 中 ($100\ \mu\text{M}$ の FeCl_3 , ZnCl_2 , MnSO_4 のいずれかが含まれている) において、再び OD_{600} が 1.0 になるまで 30°C において振盪培養を行った。 OD_{600} が 1.0 になったことを確認した後、遠心分離により細胞をペレット状にし、滅菌水により洗浄することで金属を除去し、 OD_{600} が 0.1 になるように調整した。

4-2-2-5-3. スポットティング

上記で濃度調整した培養液について、水を用いて 10^{-1} ~ 10^{-6} までの希釈系列を作成し、5 μL ずつを固形培地上にスポットティングした。用いた形質転換体と固形培地の組み合わせは以下の通りである。(表示は、発現ベクター/酵母株)

ApDMT/DEY1453 と ApDMTRP/DEY1453、空ベクターEV/DEY1453、ApDMT/DY1457 は、ApDMTRP/DY1457、EV/DY1457 は、 $\text{pH}4.0$ に調整し、 $10\ \mu\text{M}$ FeCl_3 もしくは $10\ \mu\text{M}$ Fe chelator BPS が添加された SD-U 培地上にスポットした。

ApDMT/ZHY3 と ApDMTRP/ZHY3、空ベクターEV/ZHY3、ApDMT/DY1457 は、ApDMTRP/DY1457、EV/DY1457 は、 $\text{pH}5.8$ に調整し、 $100\ \mu\text{M}$ ZnCl_2 もしくは $10\ \mu\text{M}$ の FeCl_3 と ZnCl_2 を加えた $100\ \mu\text{M}$ の Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) が添加された SD-U 培地上にスポットした。

ApDMT/smf1、ApDMTRP/smf1、空ベクターEV/smf1、ApDMT/BY4743、ApDMTRP/BY4743、EV/BY4743 は $\text{pH}5.2$ に調整し、 $100\ \mu\text{M}$ MnSO_4 もしくは $12.5\ \text{mM}$ のグリコー ルエーテルジアミン四酢酸 (EGTA) を添加した SD-U 培地上にスポットした。

その後、 30°C において培養し、3 日~5 日後に生育を確認した。

4-2-2-6. 金属取込量測定

4-2-2-6-1. 前培養

金属取込実験は、鉄、亜鉛、マンガン、カドミウム、銅、鉛について実施した。鉄、亜鉛、マンガンについては取り込み能欠損株と野生型株を、取り込み能欠損株のないカドミウム、銅、鉛については野生型株のみを用い、4-2-2-3.において選択した別個のコロニーを用い、 $n=3$ で実施した。各酵母のコロニーを 5 mL の液体 SD-Ura 培地中で OD_{600} が 1.0 を超えるまで 30°C で培養し、その後 $6000\times g$ で 5 分間遠心分離して回収した。

4-2-2-6-2. 金属含有培地中での本培養

回収したペレットから、各重金属 (FeCl_3 , ZnCl_2 、 MnSO_4 , CdCl_2 , PbCl_2 , CuCl_2) のいずれか 1 つを $2\ \mu\text{M}$ 添加した液体 SD-Ura 培地 10 mL を用いて、 30°C で 24 時間、一晩、250 rpm で振とう培養した。その後、酵母細胞を 3,500 rpm で 5 分間遠心分離してペレット化し、氷

冷 20 mM EDTA で洗浄した後、滅菌水で 3 回洗浄した。得られたペレットは 70°C で 36 時間乾燥させた。

4-2-2-6-3. ICP-MS

乾燥させた細胞を 0.5 mL 68% ultrapure HNO₃ (Tama Chemicals Co., Kanagawa, Japan, TAMAPURE-AA-100) 中で 60°C で 48 時間分解した。分解液を分析に適した濃度に希釈した。分解希釈溶液中の Fe、Zn、Mn、Cd、Pb、および Cu 濃度は、ICP Multi-Element Standards IV (Merck, Darmstadt, German) から得られた感度係数に基づいて、誘導結合プラズマ質量分析法 ICP-MS (Agilent 7700x ICP-MS, Agilent Technologies Inc., Santa Clara) を使用して定量した。手順ブランクも評価し、無視できる程度であることを確認した。細胞内の金属蓄積を計算し、酵母光学密度 (OD₆₀₀) で正規化した。Fe、Zn、Mn、Cd、Pb、および Cu についての NIST SRM2976 (イガイ組織) の典型的な再現性および精度は、それぞれ 9% および 145%、5% および 135%、3% および 129%、3% および 123%、4% および 105%、および 8% および 124% であった。

4-3. 結果

4-3-1. 電気生理学的解析

解析を行う前に、EGFPcRNA をインジェクションした卵母細胞において蛍光を確認し、卵母細胞の質及び実験系や手技に大きな間違いがないかを確認した (図 4-3)。

何もインジェクションしていない卵母細胞において、pH7.5 から pH5.5 まで下げた後に鉄を含む溶液を灌流させたが波形に変化はみられなかった (図 4-4)。

コントロールとして水をインジェクションした卵母細胞において、pH7.5 から pH5.5 まで下げた後に鉄を含む溶液を灌流させたが波形に変化はみられなかった (図 4-5)。

次に、BsDMTcRNA をインジェクションした卵母細胞において、pH7.5 から pH5.5 まで下げた後に鉄あるいはカドミウムを含む溶液を灌流させたが波形に変化はみられなかった (図 4-6)。

CgDMTRPcRNA をインジェクションした卵母細胞において、pH7.5 から pH5.5 まで下げた後に鉄・カドミウム・亜鉛・鉛・水銀・銅を含む溶液を灌流したが、波形に変化はみられたものの、金属取込に関与した有意な変化ではなかった (図 4-7、4-8)。同様の卵母細胞に、カルシウムを含む溶液を灌流した場合も、金属取込に関して有意な波形の変化は観察されなかった (図 4-7)。

ApDMTcRNA および ApDMTRPcRNA とともに EGFPcRNA をインジェクションした卵母細胞において、蛍光を確認した (図 4-9)。この蛍光が確認された卵母細胞において、膜電位の測定を行った。

ApDMT と EGFP を発現させた卵母細胞において、鉄・カドミウム・亜鉛を含む溶液をそ

れぞれ灌流させたが、金属取込に関して有意な波形の変化は観察されなかった（図 4-10）。ApDMTRP と EGFP を発現させた卵母細胞において、鉄を含む溶液を灌流させたが、金属取込に関して有意な波形の変化は観察されなかった（図 4-11）。

以上より、アフリカツメガエル卵母細胞における組換え発現と電気生理学的解析では、DMT と DMTRP の金属取り込み能を明確に検出することはできなかった。

4-3-2. 組換え酵母における発現局在

酵母による組換え実験を始めるにあたって、まず組換え発現させた ApDMT および ApDMTRP が細胞膜上に正しく発現するかを、蛍光タンパク質 EGFP との融合タンパクとして発現させることで確認した。

ApDMT-EGFP と ApDMTRP-EGFP 融合タンパク質を発現させた酵母、及び EGFP のみを発現させた酵母において、蛍光が観察された（図 4-12）。このうち、EGFP のみを発現させた酵母においては細胞全体から蛍光が観察されたのに対し、ApDMT-EGFP と ApDMTRP-EGFP 融合タンパク質を発現させた酵母においては細胞膜上でより強い蛍光が観察された。以上より、ApDMT-EGFP と ApDMTRP-EGFP 融合タンパク質は膜上に発現していることが確認できた。融合タンパク質の EGFP 部分は細胞膜の内側に突出した形で存在すると考えられるが、取り込みに何らかの影響を及ぼす可能性があるため、以下の実験では、EGFP を含まないベクターを用いた。

4-3-3. スポットアッセイ

鉄取込能欠損株 DEY1453 において ApDMT あるいは ApDMTRP を発現させた形質転換体を FeCl_3 のみを添加したプレートにスポットして培養し、なにも発現させなかった場合と比較しても生育に大きな違いは見られなかった。一方、野生株においては、ApDMT を発現させると生育が悪くなり、ApDMTRP を発現させると生育がよくなる傾向がみられた（図 4-13）。

FeCl_3 に、そのキレート剤である BPS を加えた場合も、 FeCl_3 のみを添加したプレートにおける結果と同様の傾向がみられた（図 4-14）。

次に、亜鉛取込能欠損株 ZHY3 に ApDMT あるいは ApDMTRP を発現させた形質転換体を、 ZnCl_2 のみを添加したプレートにスポットし、なにも発現させなかった場合と比較しても生育に大きな違いは見られなかった。一方、野生株においては、ApDMT を発現させると生育が悪くなり、ApDMTRP を発現させると生育がよくなる傾向がみられた（図 4-15）。 ZnCl_2 に、そのキレート剤である EGTA を加えた場合、亜鉛取込能欠損株 ZHY3 においては何も発現させない場合、ApDMT を発現させた場合、ApDMTRP を発現させた場合のいずれにおいても、ほとんど生育はみられなかった。一方野生株においては、ApDMTRP を発現させた方が生育がよくなる傾向がみられた（図 4-16）。

マンガン取込能欠損株 *smf1* に ApDMT あるいは ApDMTRP を発現させた形質転換体を、 MnSO_4 のみを添加したプレートにスポットし、なにも発現させなかった場合と比較しても、ApDMT をマンガン取込能欠損株 *smf1* に発現させた方が生育が悪くなる傾向が見られた。ApDMTRP を発現させても生育に大きな違いは見られなかった。一方、野生株においては、ApDMT を発現させると生育が悪くなり、ApDMTRP を発現させると何も発現させなかった場合と同等またはやや生育がよくなる傾向がみられた (図 4-17)。

MnSO_4 に、そのキレート剤である EDTA を加えた場合は野生株・*smf1* いずれに発現させた場合も、ApDMT を発現させた酵母の方が発育が悪く、ApDMTRP を発現させた方が発育が良くなる傾向がみられた (図 4-18)。

以上の結果は、DMT の発現は増殖を阻害し、DMTRP の発現は増殖を促進する傾向が見られたが、その違いがどのような原因によるのかはスポットアッセイではわからないため、次に組換え酵母を金属を含む培地中で培養し、培養後に金属取込量の測定を試みた。

4-3-4. 金属取込量測定

鉄曝露の場合、変異株・野生株ともに ApDMT 発現酵母においてコントロール (空ベクター; EV) に比べて細胞内鉄濃度が増加し、ApDMTRP 発現酵母においては減少する傾向にあった (図 4-19a, b)。マンガン曝露の場合には、変異株・野生株ともに ApDMT 発現酵母の Mn 取込量はコントロールおよび ApDMTRP 発現酵母に比べて有意に高かったが、ApDMTRP 発現酵母とコントロールの間に差はなかった (図 4-19c, d)。また、Zn 曝露の場合、ApDMTRP 発現酵母では、コントロールおよび ApDMT 発現酵母に比べて Zn の取込量が有意に少なかった (図 4-19e)。また、野生型株を用いた実験でも、ApDMTRP 発現酵母の Zn 取込量がコントロールおよび ApDMT 発現酵母よりも少ないという同様の傾向が観察されたが、統計的には有意ではなかった (図 4-19f)。

取り込み欠損変異体が存在しないカドミウム、鉛、銅については、野生型株のみで実験を行った。ApDMT を発現する酵母はコントロールおよび ApDMTRP を発現する酵母と比較してカドミウムを取り込む傾向があった (図 4-19g)。ApDMT 発現酵母は、コントロールと比較して鉛蓄積量が有意に増加した (図 4-19h)。細胞内の銅濃度は、ApDMT 発現酵母では、ApDMTRP 発現酵母およびコントロールよりも高かったが、その差は統計的に有意ではなかった (図 4-19)。

4-4. 考察

アフリカツメガエル卵母細胞上での 2 電極膜電位固定法において、ApDMT および ApDMTRP の機能に関して、明瞭な結果を得ることはできなかった。この結果に関して、①手技に不手際があり実験系がうまく動いていなかった、②卵母細胞の質が悪く遺伝子発現がうまくいかなかった、③電極の出来がよくなかった、といった原因が考えられた。しかし、ApDMT および ApDMTRP 以外にも同時に EGFP をインジェクションし、その蛍光を

確認していたこと（図 4-3、4-9）、EGFP を発現させていない卵母細胞においても、灌流を開始する前の卵母細胞における静止膜電位を確認し、卵母細胞が健康であること、電極が正常に機能していることを確認していたことから、これらの可能性は低いと考えられ、明瞭な電位変化が検出できない理由を突き止めることはできなかった。

次に、酵母での組換え発現系に取り組んだ。酵母における DMT の組換え発現は、植物の DMT では報告されており（Ullah et al., 2018）、本研究はその手法を参考に実施したが、動物の DMT を酵母で発現させた例はこれまでなかった。そこで、まず細胞膜上に正しく発現することを、蛍光タンパク質（EGFP）との融合タンパクとして発現させることにより確認した。ApDMT-EGFP と ApDMTRP-EGFP 融合タンパク質を発現させた酵母、及び EGFP のみを発現させた酵母から、それぞれ蛍光が観察されたが、EGFP のみを発現させた酵母においては細胞全体から蛍光が観察されたのに対し、ApDMT-EGFP と ApDMTRP-EGFP 融合タンパク質を発現させた酵母においては細胞膜上でより強い蛍光が観察された（図 4-12）。このことより、ApDMT、ApDMTRP とともに、DMT 遺伝子において過去に報告されているのと同様に（Bai et al., 2004）、細胞膜上に発現していることが確認された。

スポットアッセイの結果、FeCl₃ のみを添加したプレートにおいて、鉄取込能欠損株 DEY1453 上に ApDMT あるいは ApDMTRP を発現させた形質転換体では、なにも発現させなかった場合（EV）と比較しても生育に大きな違いは見られなかった。一方、野生株においては、ApDMT を発現させると生育が悪くなり、ApDMTRP を発現させると生育がよくなる傾向がみられた。このことより、野生株において DMT を発現させることにより、細胞内に過剰に鉄が取り込まれることにより、過剰な鉄の毒性により生育が阻害された可能性が考えられた（Cabantchik et al., 2005）。一方 DMTRP を発現させた酵母においては生育が何も発現させていない株よりも生育がよくなっており、このことより、DMTRP は細胞内の鉄濃度を適切に保つ機能がある可能性が考えられた。ZnCl₂ のみを添加したプレート上で、亜鉛取込能欠損株 ZHY3 にて ApDMT あるいは ApDMTRP を発現させた形質転換体の生育は、なにも発現させなかった場合と比較しても大きな違いは見られず、一方、野生株においては、ApDMT を発現させると生育が悪くなり、ApDMTRP を発現させると生育がよくなる傾向がみられた。このことから、DMT が野生株上に発現することにより、細胞内に過剰に亜鉛が取り込まれることにより生育が阻害された可能性が考えられた（Singh et al., 2017）。マンガンに関して、MnSO₄ のみを添加したプレートおよびマンガンのキレート剤である EDTA を添加したプレート、どちらにスポットした場合でも、マンガン取込能欠損株発現 smf1 および野生株に ApDMT を発現させた場合、生育が悪くなる傾向が見られた。一方、ApDMTRP を発現させた場合は、生育が良くなる傾向が見られた。マンガンは様々な酵素の補酵素として、特にヒトの健康において必須であるが、一方で過剰摂取により毒性を示すことが知られている（O'Neal & Zheng, 2015）。このことより他の金属と同様に、マンガンにおいてもこのような結果となったのではないかと考えられた。

実際の金属の取り込みを調べるために、金属含有培地中で培養した後に重金属量測定を

行った結果、ApDMT を発現させた酵母において、鉄・カドミウム・亜鉛・マンガン・鉛・銅の細胞内濃度は増加傾向にあった。このことより、ApDMT は哺乳類における DMT と同様に (Gunshin et al., 1997)、細胞内に金属を取り込む輸送体であることが明らかになった。一方、ApDMTRP を発現させた酵母においては、マンガンを除いて細胞内の金属濃度は増加しなかった。むしろ、ApDMTRP を発現させた酵母は、亜鉛曝露時に細胞内の亜鉛濃度が、亜鉛取込能欠損株において有意に低下した。統計的に有意ではなかったが、同様の結果は ApDMTRP を発現させた野生株においても確認された。鉄・カドミウムといった他の金属においても、ApDMTRP を発現させた酵母においては細胞内の金属濃度が低下するという、同様の傾向がみられた。これらの結果から、構造が似ているにもかかわらず、ApDMT のような細胞内への金属の取り込み能は ApDMTRP ではなく、金属、特に亜鉛の細胞内濃度を低下させる機能があることがわかった。

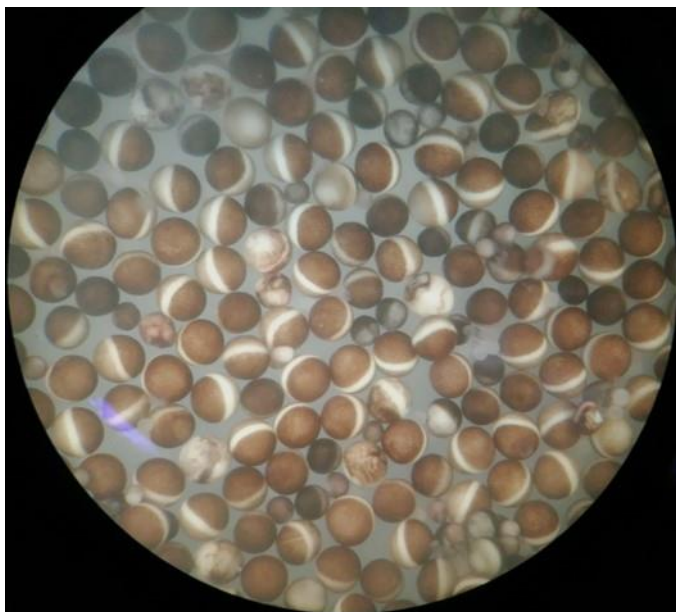


図 4-1. アフリカツメガエル卵巣より採取した卵母細胞。直径が小さい、形が歪など、発現解析に適さないものが多く混じっている。

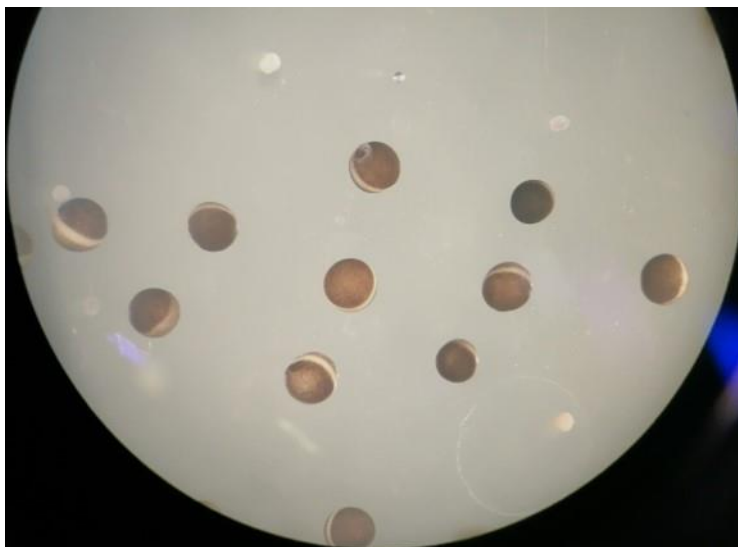


図 4-2. インジェクション用に選抜したアフリカツメガエル卵母細胞。①動物極と植物極の境い目がはっきりしているもの、②極端に大きすぎず、また小さすぎないもの、③形が歪でないもの、④動物極あるいは植物極にシミのないもの、という条件をより多く満たしたものを選抜した。

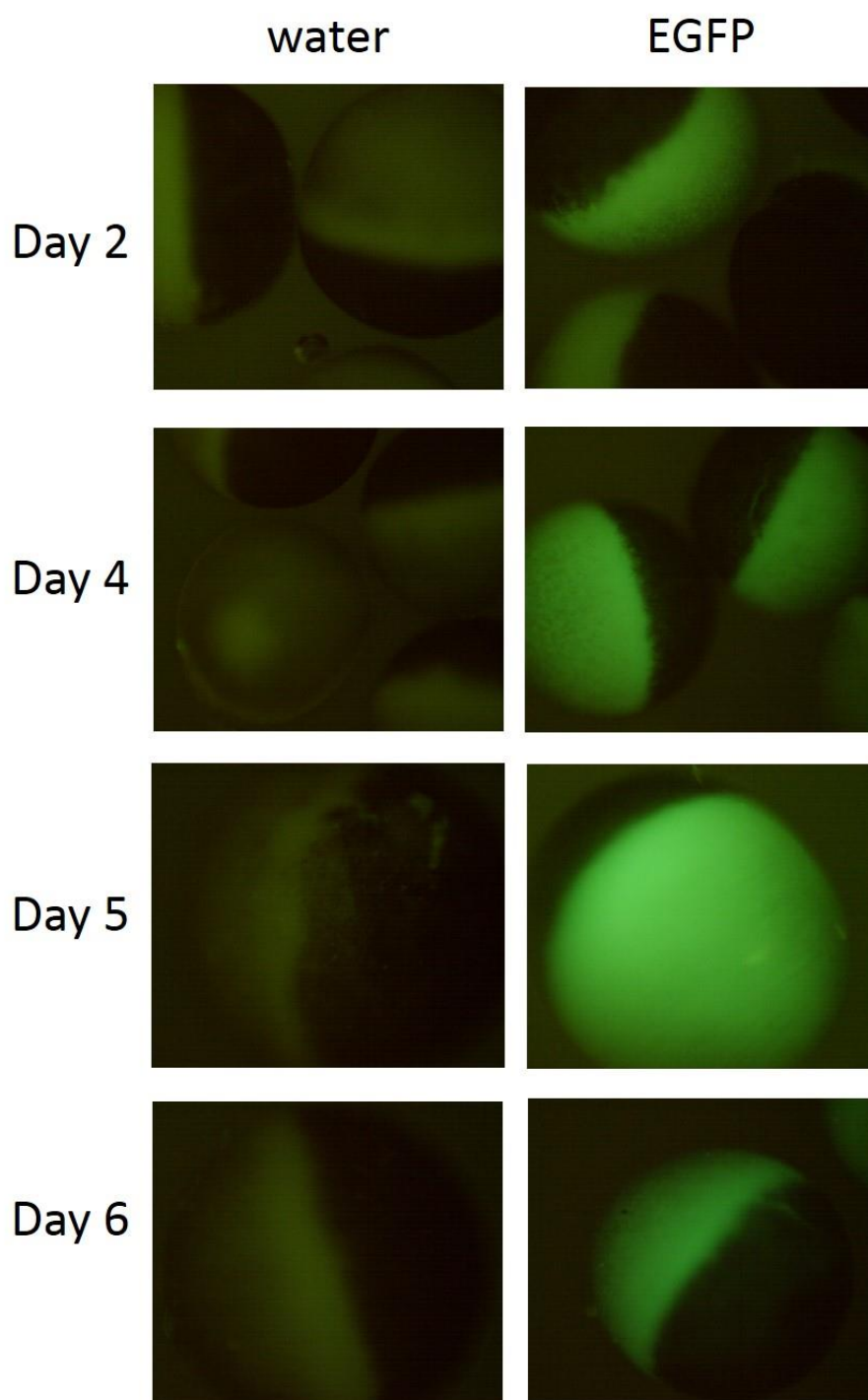


図 4-3. EGFPcRNA をインジェクションした卵母細胞。インジェクションの 2、4、5、6 日後に蛍光顕微鏡下で EGFP の発現を確認した。EGFP, EGFPcRNA をインジェクションした実験区 ; Water, 水をインジェクションした対照区

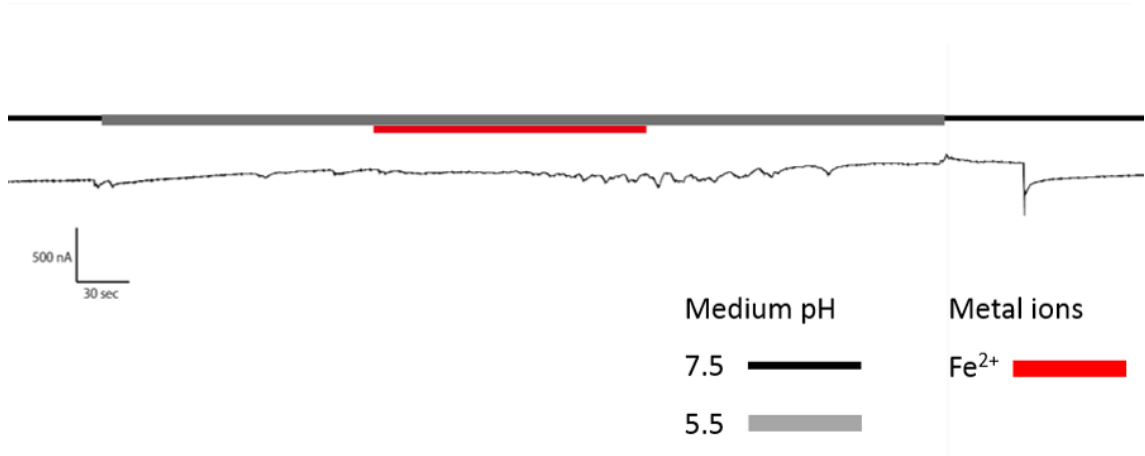


図 4-4. 何もインジェクションしていない卵母細胞における、鉄を含む溶液を灌流させた場合の膜電流。

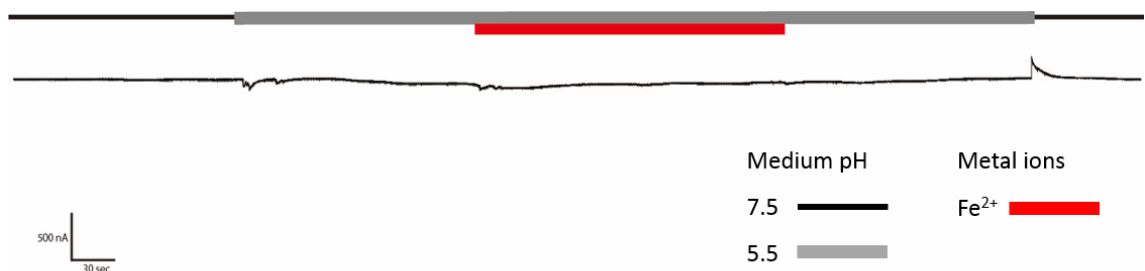


図 4-5. 水をインジェクションした卵母細胞における、鉄を含む溶液を灌流させた場合の膜電流。

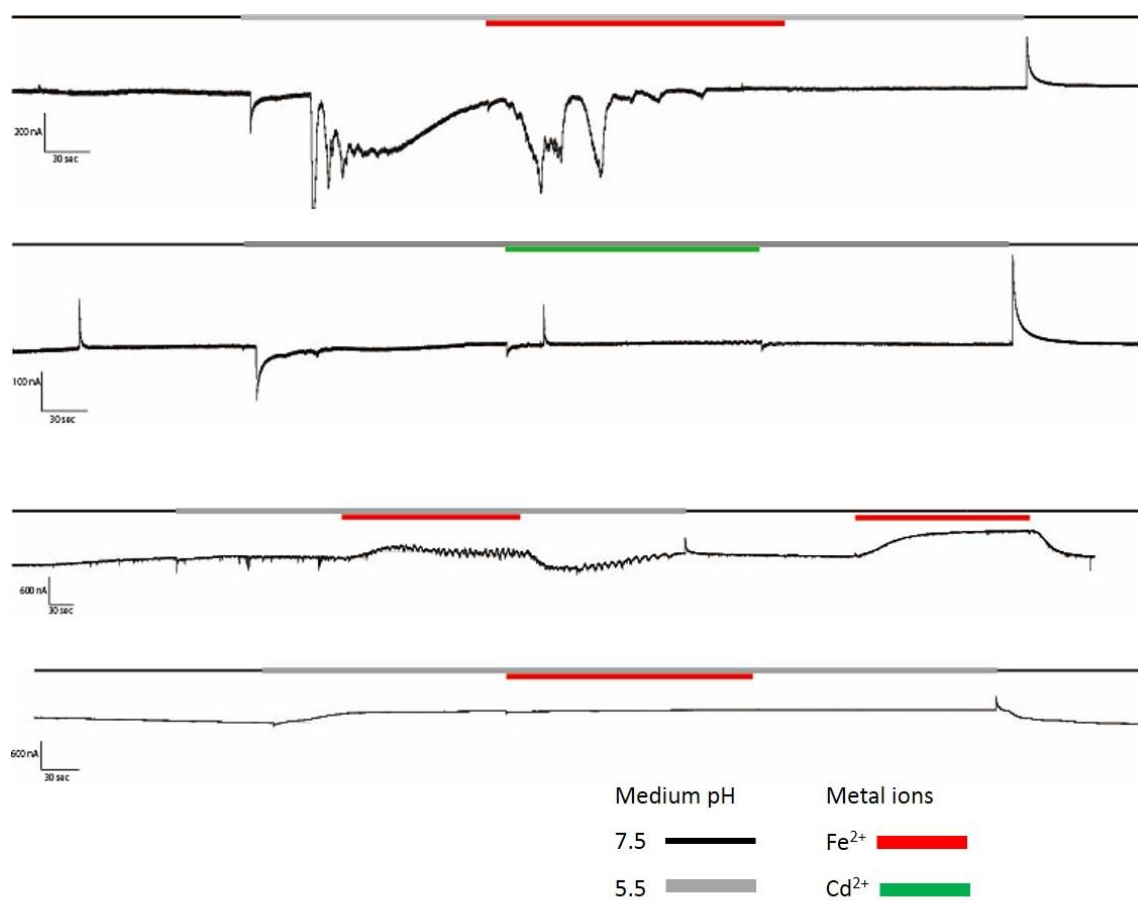


図 4-6. BsDMTcRNA を打ち込んだ卵母細胞における、鉄またはカドミウムを含む溶液を灌流させた場合の膜電流。

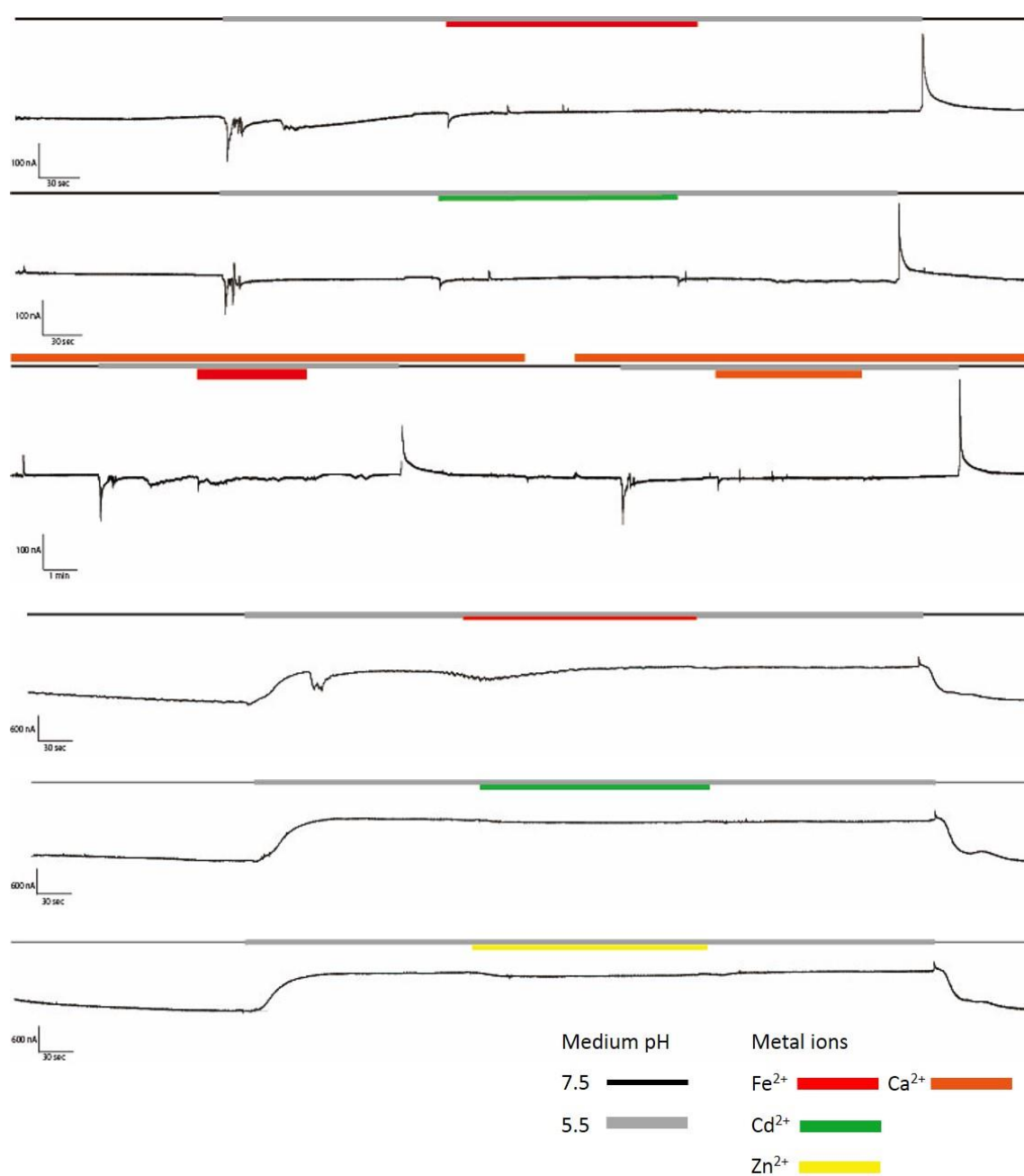


図 4-7. CgDMTRPcRNA を打ち込んだ卵母細胞における、鉄・カドミウムあるいは亜鉛を含む溶液を灌流させた場合の膜電流。

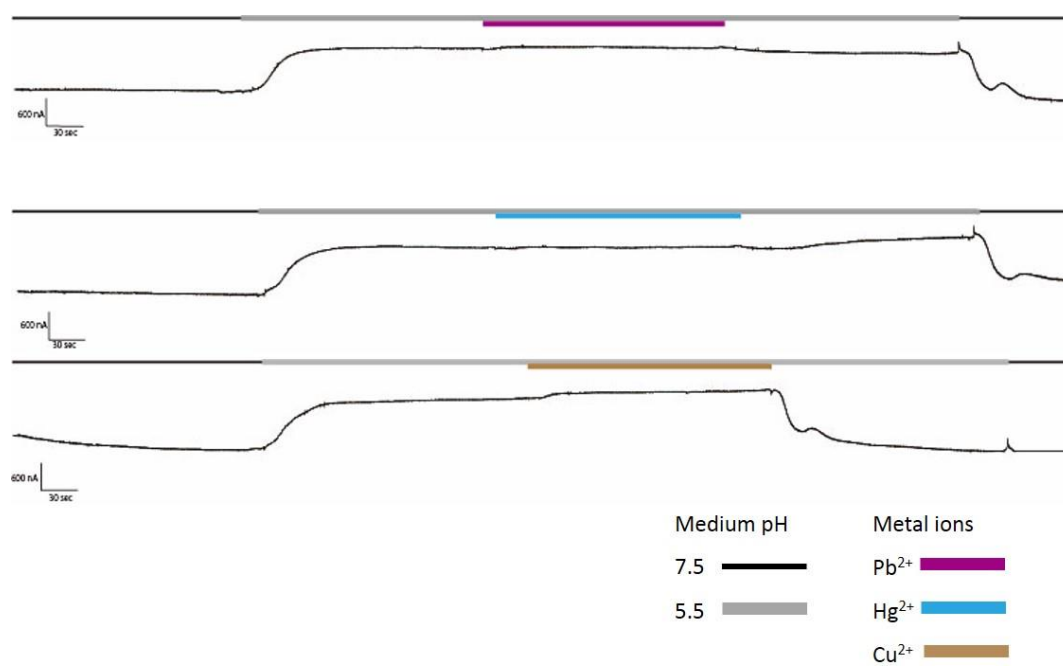


図 4-8. CgDMTRPcRNA を打ち込んだ卵母細胞における、鉛・水銀・銅を含む溶液を灌流させた場合の膜電流。

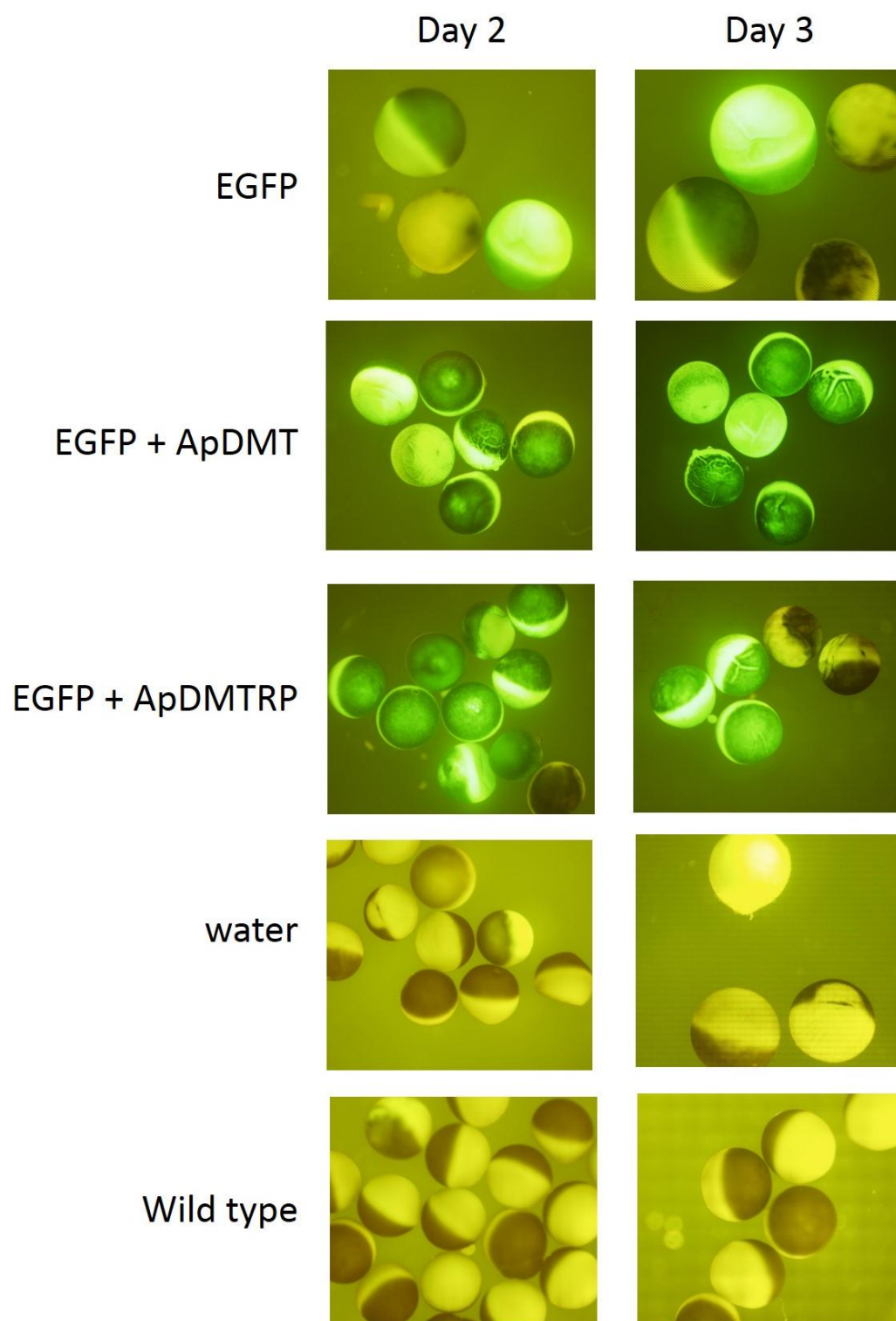


図 4-9. ApDMTcRNA および ApDMTRPcRNA とともに EGFPcRNA をインジェクションした卵母細胞における蛍光。Water, 水をインジェクションした卵母細胞；Wild type, 何もインジェクションしていない卵母細胞。それぞれインジェクション 2、3 日後に蛍光顕微鏡下で観察した。

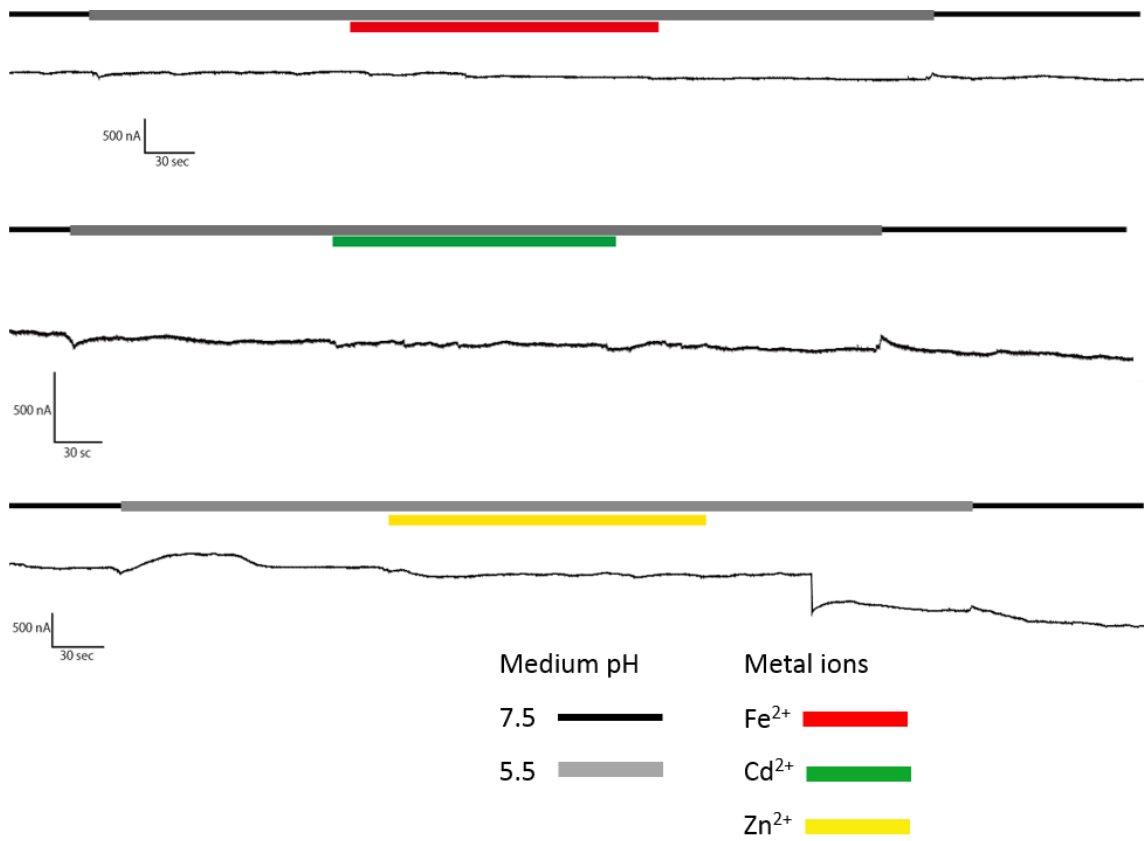


図 4-10. ApDMT と EGFP をインジェクションし、EGFP の蛍光を確認した卵母細胞における鉄・カドミウム・亜鉛を含む溶液を灌流させた場合の膜電流。

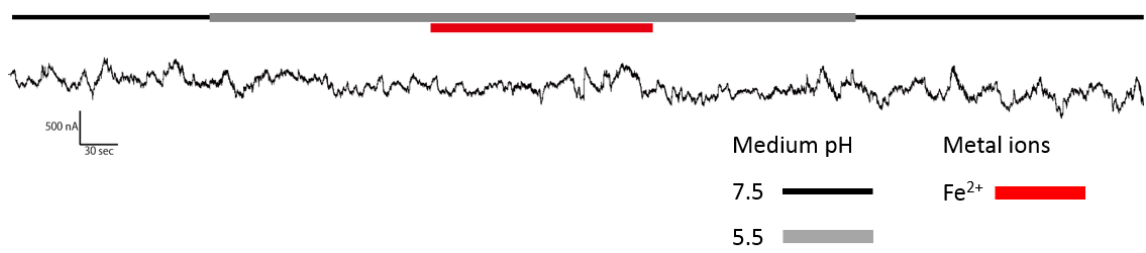


図 4-11. ApDMTRP と EGFP をインジェクションし、EGFP の蛍光を確認した卵母細胞における鉄を含む溶液を灌流させた場合の膜電流。

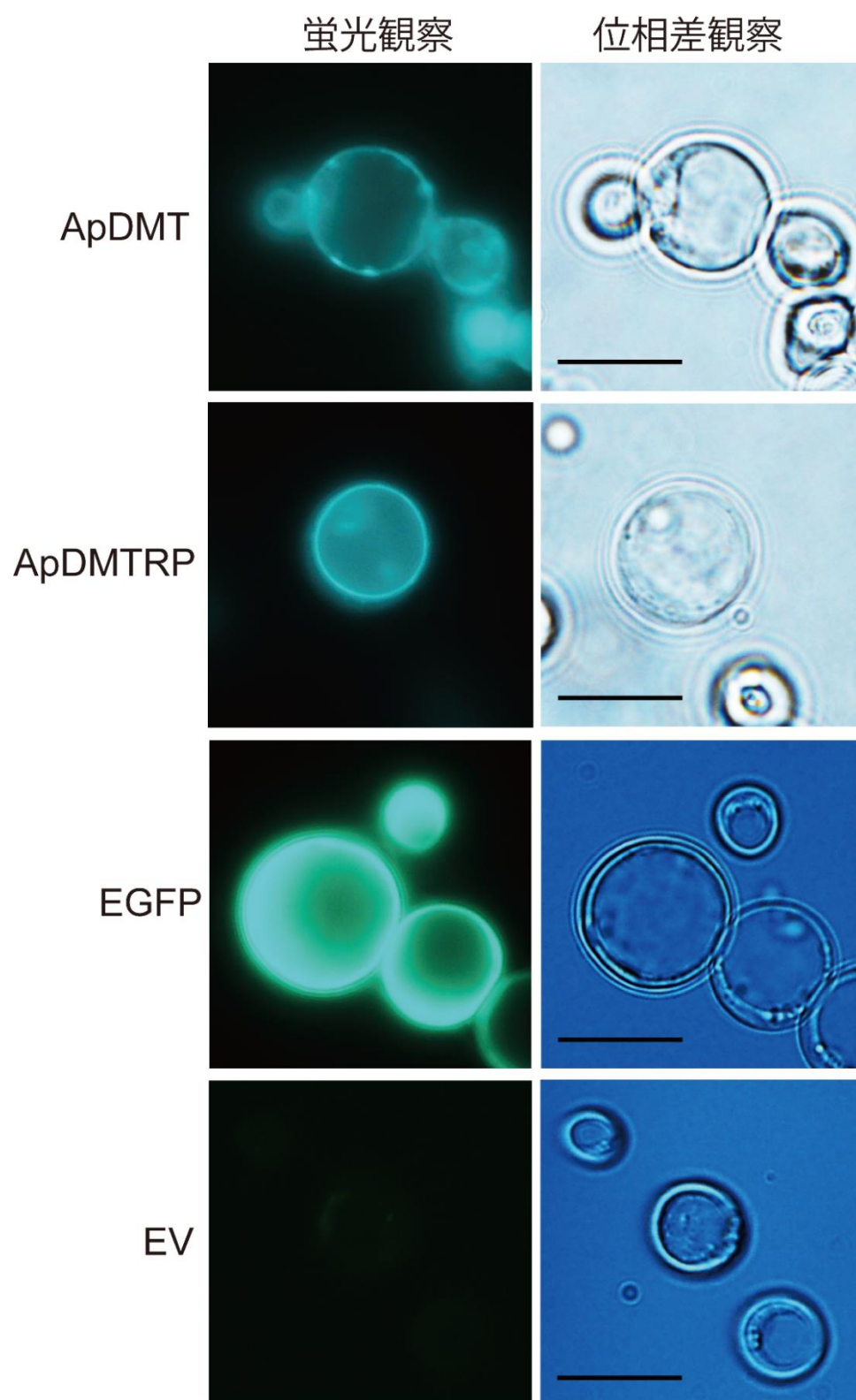


図 4-12. DMT および DMTRP を発現させた組換え酵母。ApDMT, ApDMT+EGFP 融合タンパク質；ApDMTRP, ApDMTARP+EGFP 融合タンパク質；EGFP, EGFP 単独のタンパク質；EV 空ベクター（対照区）

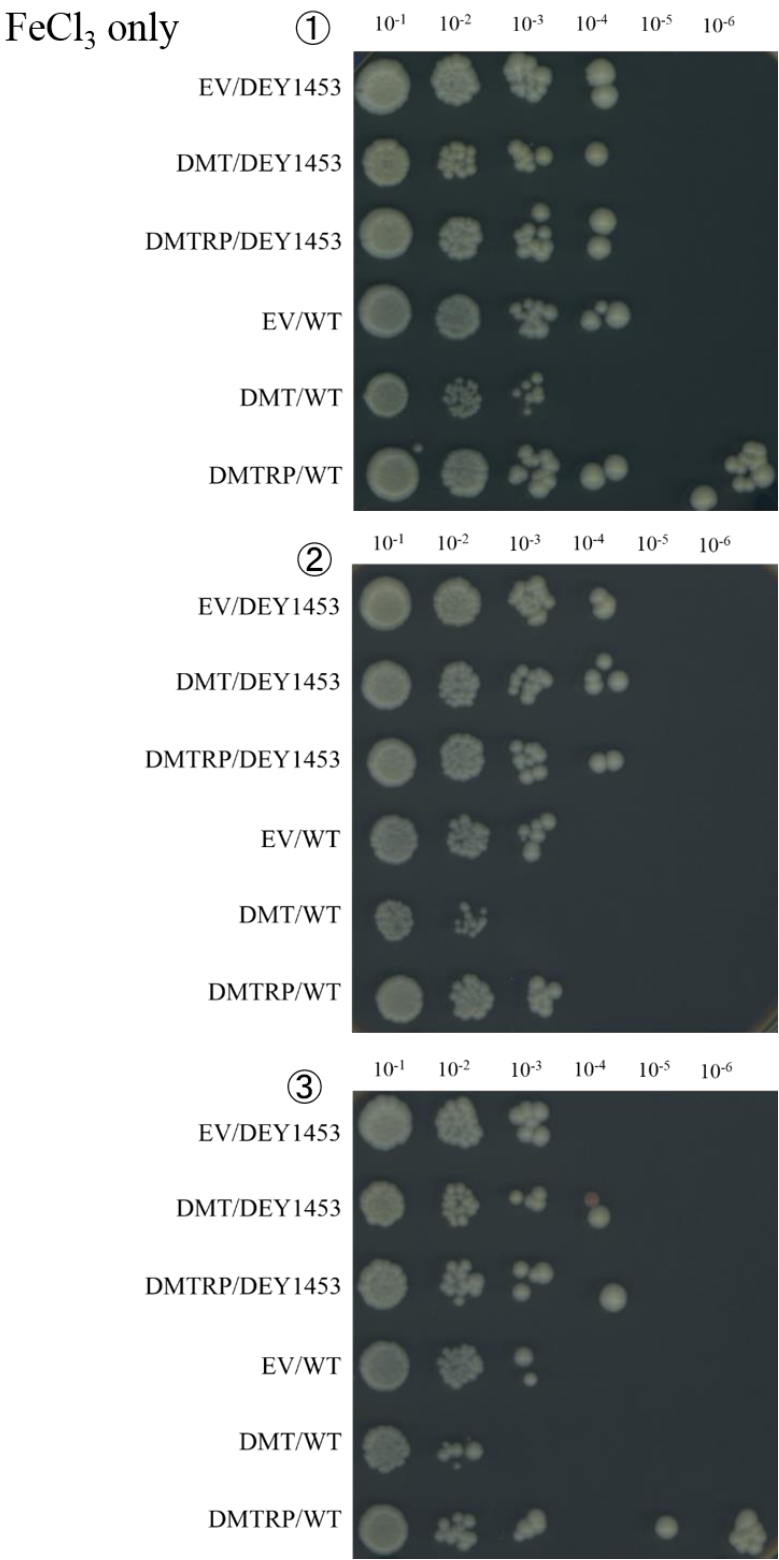


図 4-13. FeCl₃ のみを添加した培地において、鉄取込能欠損株 DEY1453 に ApDMT あるいは ApDMTRP を形質転換させた場合の生育の違い。EV は空ベクター（対照区）を、WT は野生株を意味する。①～③は独立したコロニーをそれぞれ用いて行った 3 回の実験結果。

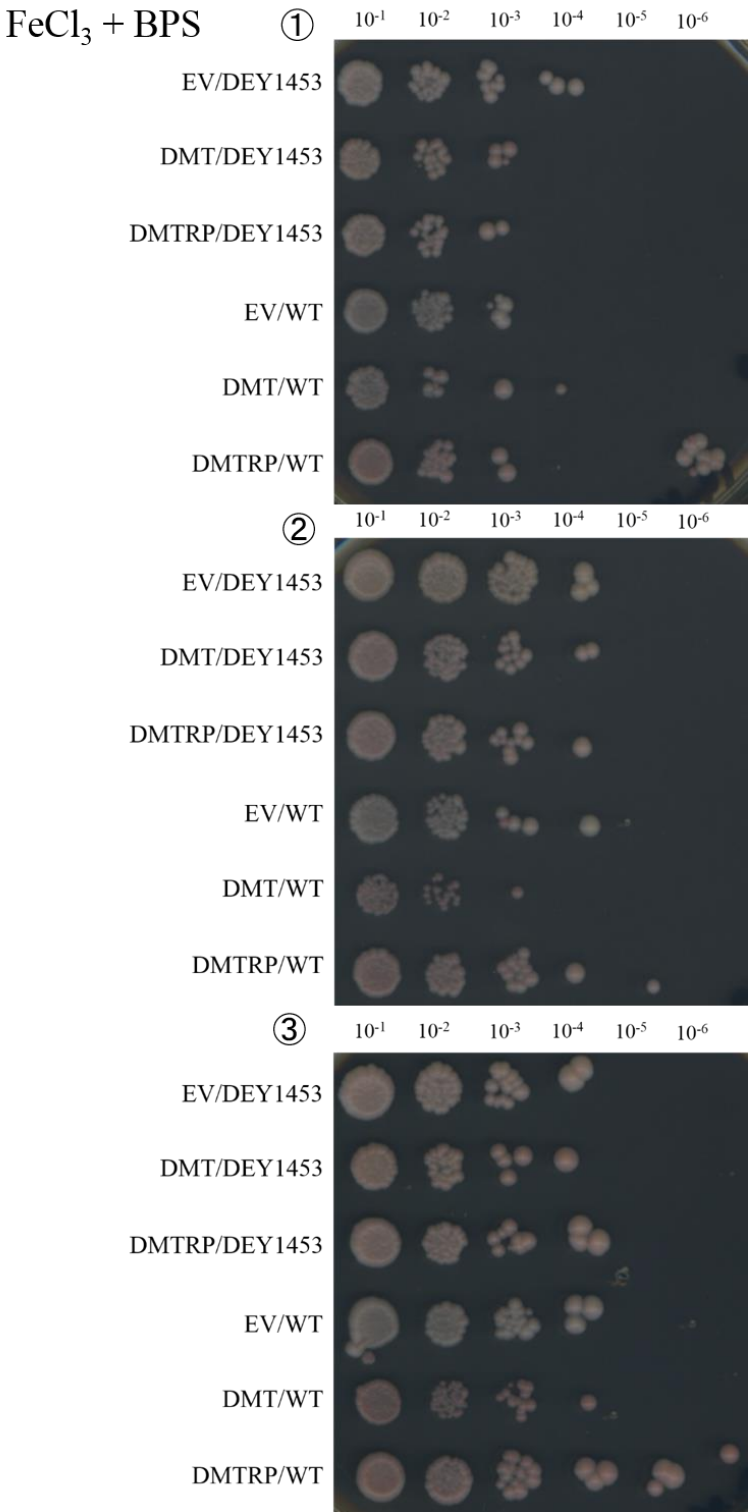


図 4-14. FeCl₃ とそのキレート剤 BPS を加えた培地において鉄取込能欠損株 DEY1453 に ApDMT あるいは ApDMTRP を形質転換させた場合の生育の違い。EV は空ベクター（対照区）を、WT は野生株を意味する。①～③は独立したコロニーをそれぞれ用いて行った 3 回の実験結果。

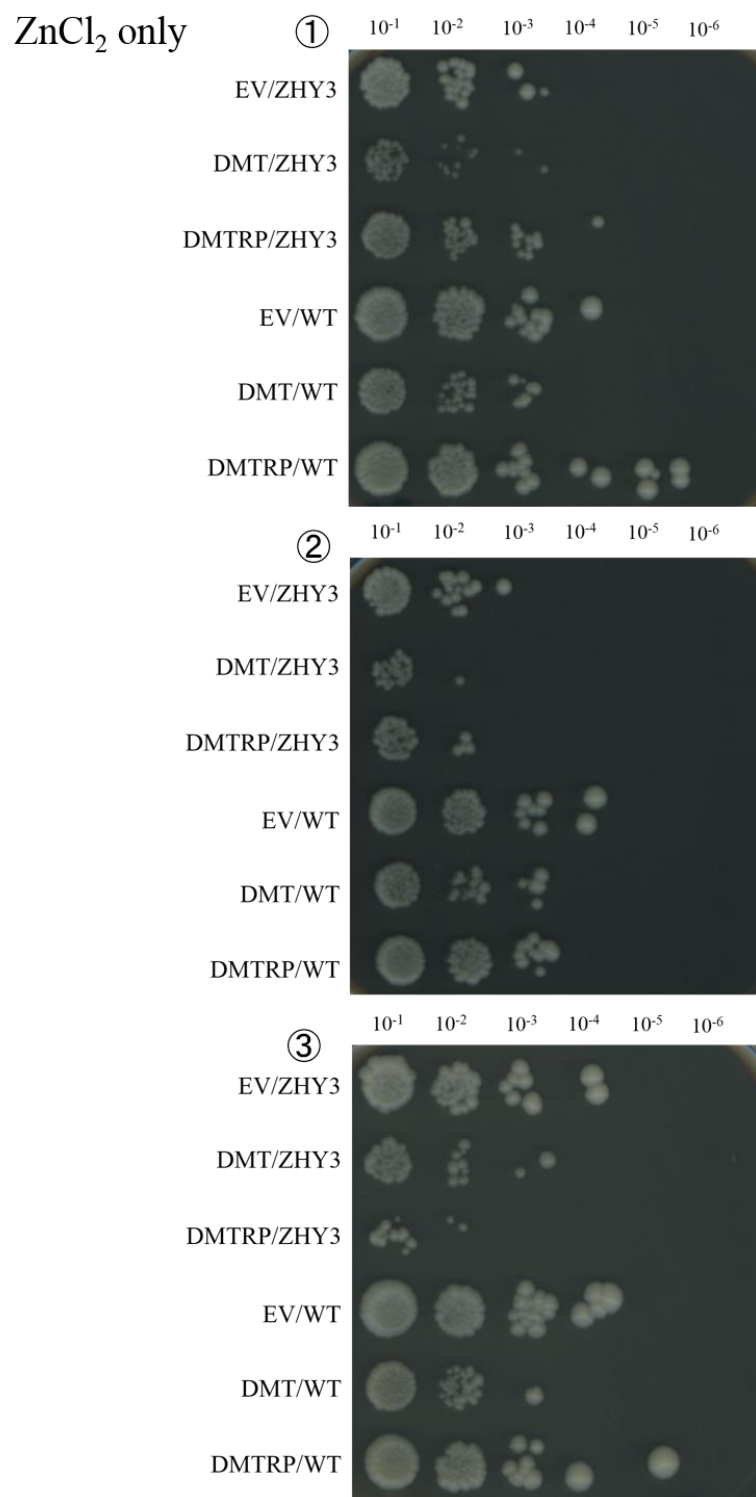


図 4-15. ZnCl₂ のみを添加した培地において、亜鉛取込能欠損株 ZHY3 に ApDMT あるいは ApDMTRP を形質転換させた場合の生育の違い。EV は空ベクター（対照区）を、WT は野生株を意味する。①～③は独立したコロニーをそれぞれ用いて行った 3 回の実験結果。

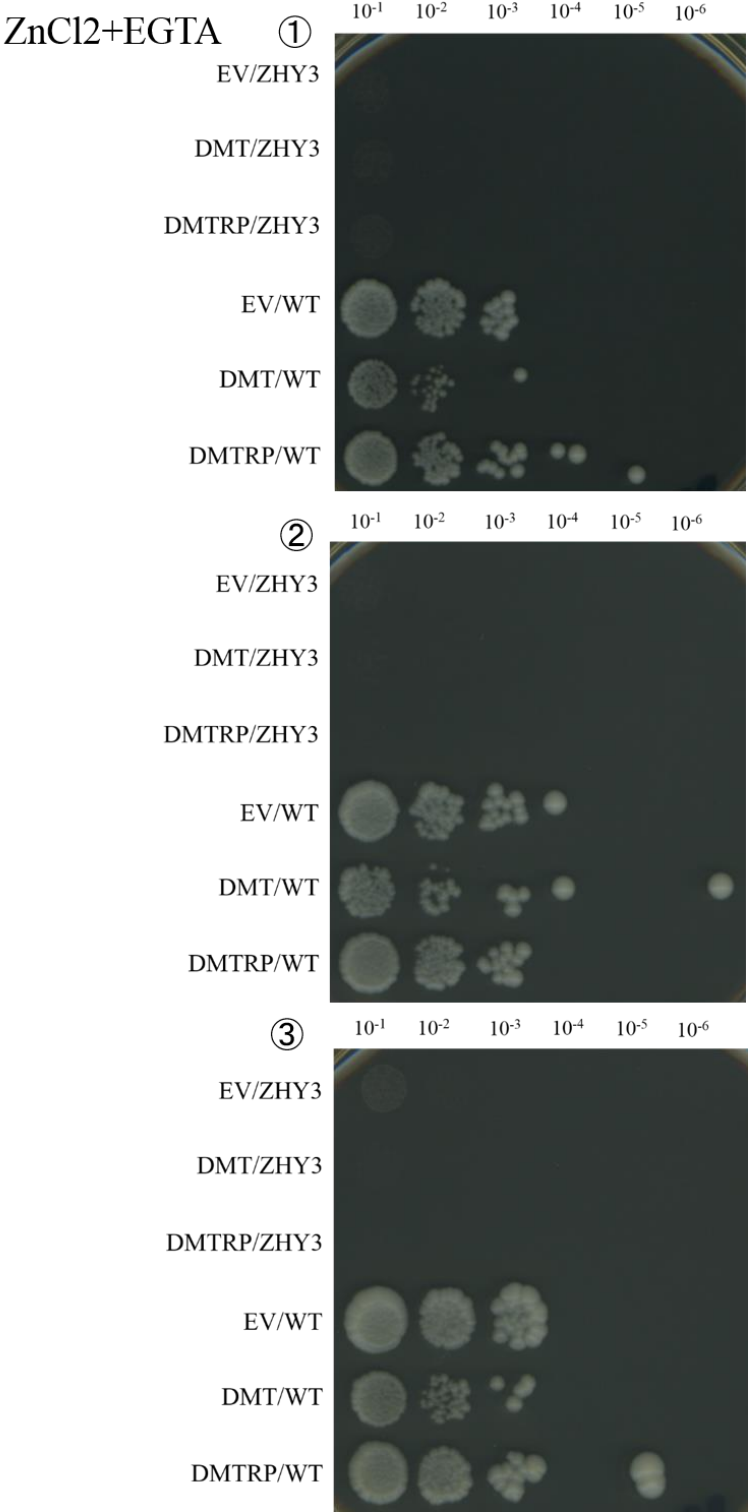


図 4-16. ZnCl₂ とそのキレート剤 EGTA を加えた培地において亜鉛取込能欠損株 ZHY3 に ApDMT あるいは ApDMTRP を形質転換させた場合の生育の違い。EV は空ベクター（対照区）を、WT は野生株を意味する。①～③は独立したコロニーをそれぞれ用いて行った 3 回の実験結果。

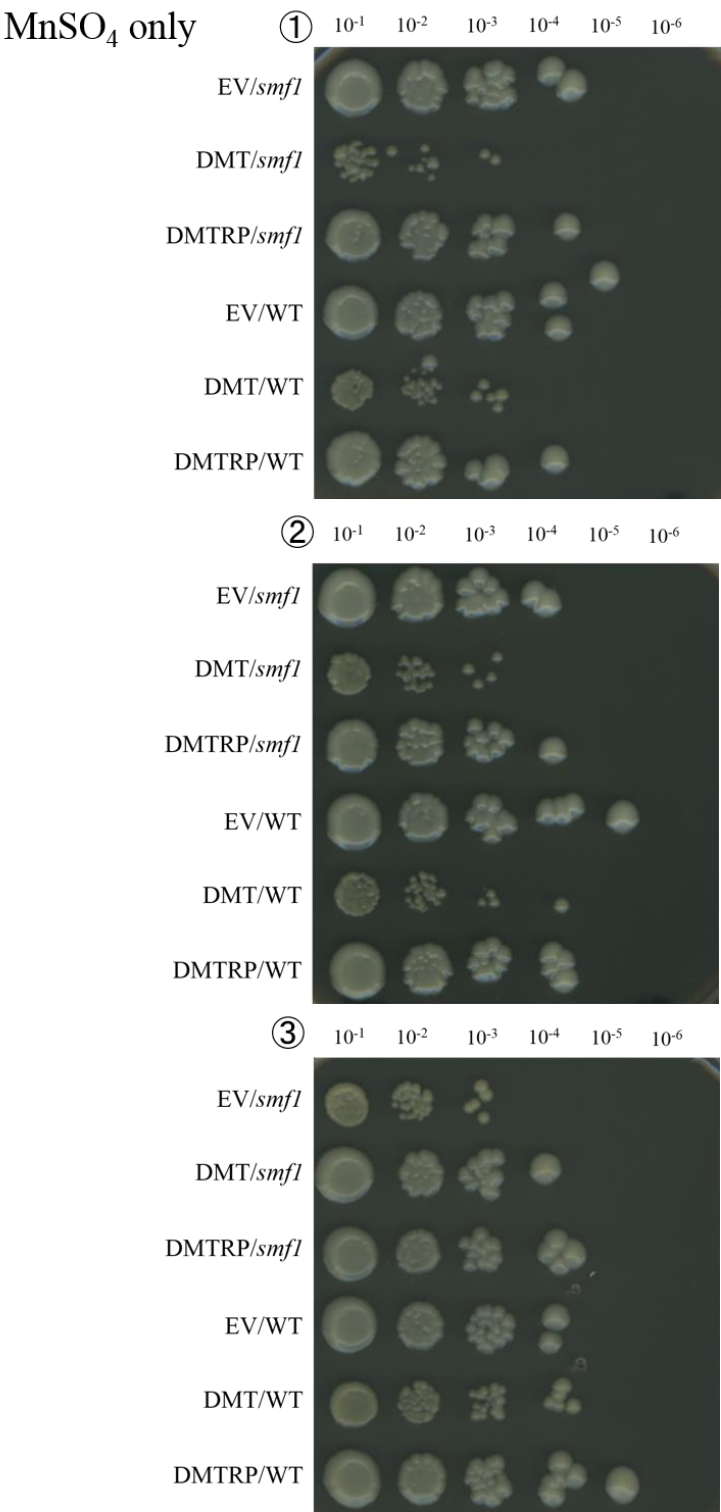


図 4-17. MnSO₄ のみを添加した培地において、マンガン取込能欠損株 *smfl* に ApDMT あるいは ApDMTRP を形質転換させた場合の生育の違い。EV は空ベクター（対照区）を、WT は野生株を意味する。①～③は独立したコロニーをそれぞれ用いて行った 3 回の実験結果。

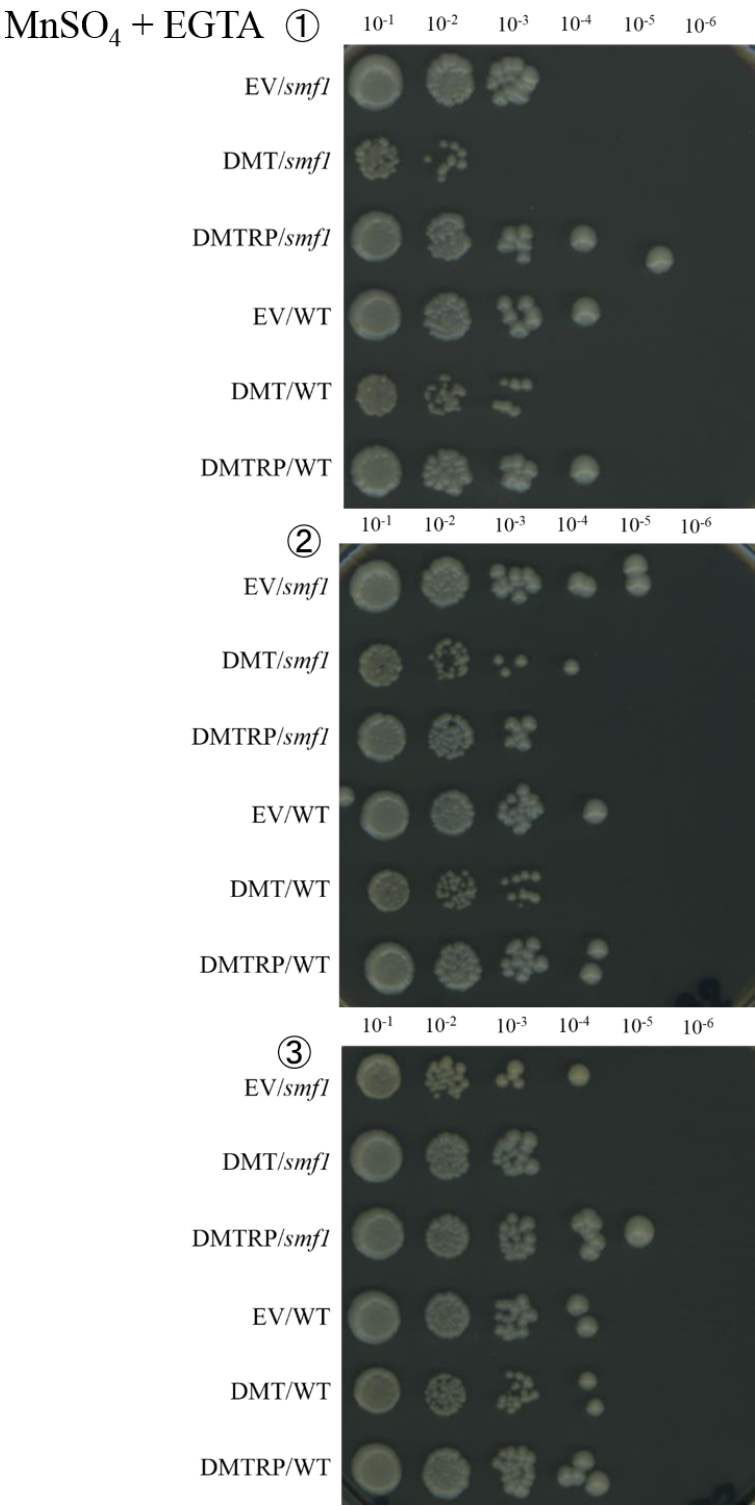


図 4-18. MnSO₄ とそのキレート剤 EDTA を加えた培地において亜鉛取込能欠損株 ZHY3 に ApDMT あるいは ApDMTRP を形質転換させた場合の生育の違い。EV は空ベクター(対照区)を、WT は野生株を意味する。①～③は独立したコロニーをそれぞれ用いて行った 3 回の実験結果。

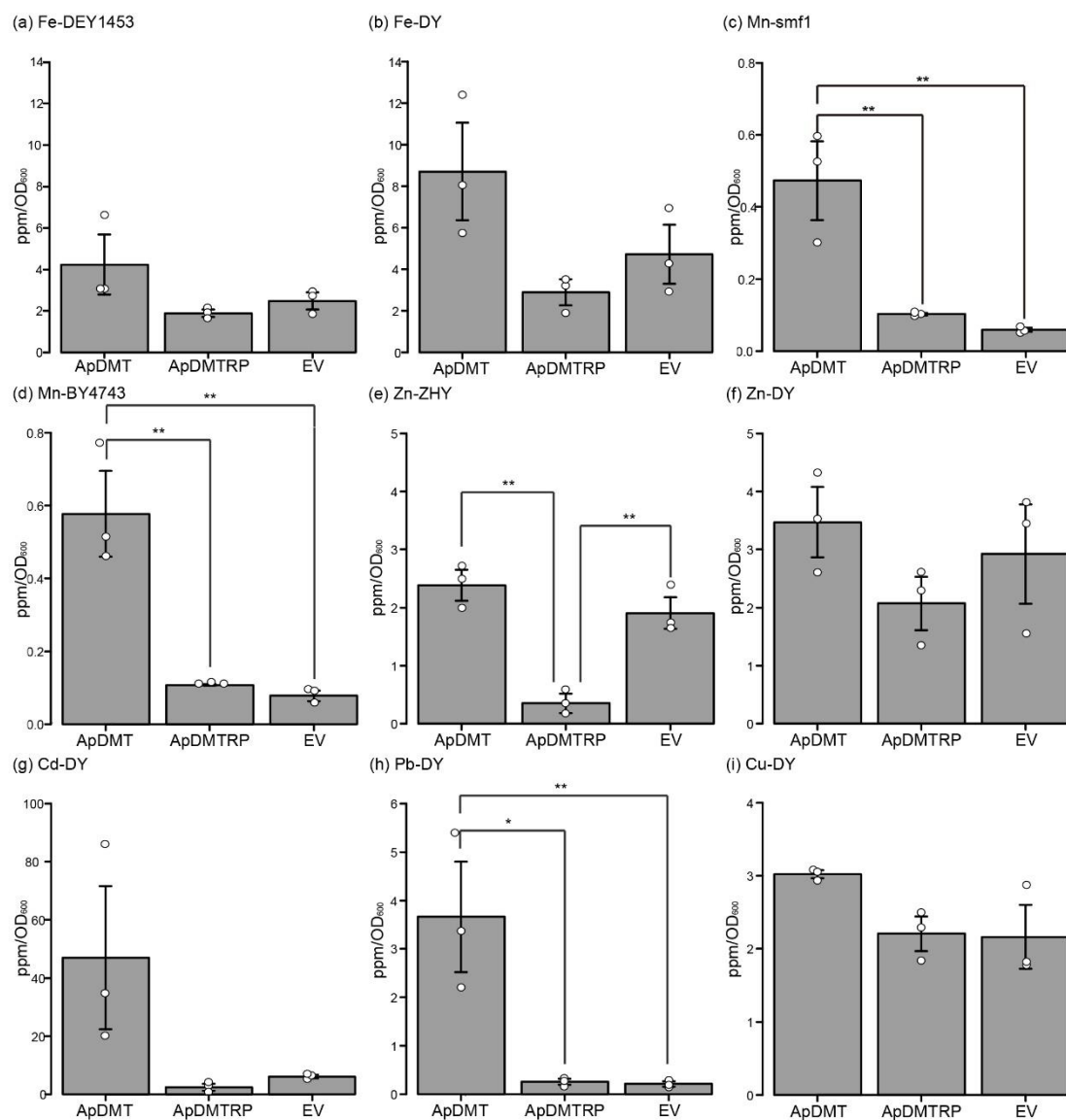


図 4-19. ApDMT、ApDMTRP を発現させた酵母細胞による金属の取り込み。(a) ~ (i) のパネルの表題は、曝露した金属名と用いた酵母株名を表す。EV は空ベクター (対照区) を、DY は野生型株を表す。

表 4-1. 使用したプライマー一覧

登場章	プライマー名	配列
4-2-1-1.	kozakBsDMT	GCCACCATGGCAGAACAGTTAGATGG
4-2-1-1.	BsDMT-scdn	TCAAATAAGTATCATAAAATATAAG
4-2-1-1.	kozakCgRP	GCCACCATGAACAAATACGCCACCCT
4-2-1-1.	CgRP-scdn	TCATAAAGCGTGGATATTTCTGG
4-2-1-1.	KozakApDMT	GCCACCATGTCTGCTGATGAAGCCAA
4-2-1-1.	ApDMT3	CTACGGATGGGCGTTGTCTT
4-2-1-1.	KozakApRP	GCCACCATGGGAAGCCCAGAGGAAGC
4-2-1-1.	Ap3RP	CTACGGATGGGCGTTGTCTT
4-2-1-1.	pNHK-F	GCCACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGC
4-2-1-1.	pNHK-R	TCACTTGTACAGCTCGTCCATGC
4-2-1-1.	T7	TAATACGACTCACTATAGGGCG
4-2-1-1.	SP6	ATTTAGGTGACACTATAGAATACTCAAG
4-2-2-2.	pPMA5	AGAAAAAAAAATATACCCAGCCTCG
4-2-2-2.	ADH3	AAATCATAAATCATAAGAAATTCGC
4-2-2-2.	pDR+ApDMT5	TATACCCAGCCTCGATGTCTGCTGATGAAGCCAA
4-2-2-2.	pDR+ApDMT3	TCATAAGAAATTCGCTACGGATGGGCGTTGTCTT
4-2-2-2.	pDR+ApRP5	TATACCCAGCCTCGATGGGAAGCCCAGAGGAAGC
4-2-2-2.	pDR+ApRP3	TCATAAGAAATTCGCTCACACAGCATCCTTTGACA
4-2-2-4.	pDR-EGFP	TCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGGCGAATTTCTTATGA
4-2-2-4.	EGFP-ApRP	ACAGCTCCTCGCCCTTGCTCACCATCACAGCATCCTTTGA
4-2-2-4.	ApDMT-EGFP	GACAACGCCCATCCGATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGT
4-2-2-4.	ApDMTRP-EGFP	TCAAAGGATGCTGTGATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGT
4-2-2-4.	EGFP-pDR	TCATAAGAAATTCGCTTGTACAGCTCGTCCATGCCGAGA

表 4-2. 使用した酵母

	鉄取込実験	亜鉛取込実験	マンガン取込実験	カドミウム・銅・鉛 取込実験
野生株	DY1457	DY1457	BY4743	DY1457
変異株	DEY1453(<i>fet3fet4</i>)	ZHY3(<i>zrt1zrt2</i>)	HomDip-YOL122C lacking SMF1	-

総合考察

DMTRP の発見

本研究では、生物が細胞に金属を取り込む輸送体の一つである、二価金属イオン輸送体 (DMT) を対象として、海産無脊椎動物の金属制御を解明しようと試みた。その研究対象としてまず、シチヨウシンカイヒバリガイとマガキを用いた (第一章)。その結果、シチヨウシンカイヒバリガイ・マガキ両者から、2つの DMT 様配列を単離することに成功した。しかし、これら配列は発現量がとても低く、スプライシングや立体構造が複雑である可能性が考えられた。そこで次に、精密なゲノム配列が発表され、RNA-seq データもアクセス可能であるオニヒトデを対象として DMT 様配列の探索を行った (第二章)。その結果、オニヒトデからも二つの DMT 様配列が単離された。これら配列は互いに類似性があり、また既知の DMT とも配列に類似性があったため、それぞれ既知 DMT と似た機能を持つ配列であることが予想された。しかし、両遺伝子が同一の scaffold 上に存在していたもののその距離が 900 kb 以上離れていたことから、両者は最近の重複で生じたのではなく、その起源は古いことが示唆された。そこで両配列の起源を探るべく、微生物・植物・動物を網羅する分子系統解析および動物 DMT 様配列のみを用いた分子系統解析を行った (第三章)。データベース検索によって得られた 78 の DMT 様配列のうち、35 種の動物の DMT 様配列がコードするアミノ酸配列によって分子系統解析を行った結果、動物の DMT 様配列は一つの共通祖先遺伝子から二つのクレードにわかれることが明らかとなった (図 3-2.)。本研究で貝類やオニヒトデから単離した 2 種の DMT 様配列のうち一方は、ヒトやラットなど、既報の DMT とクレードを形成したため、貝類やヒトデの DMT であると判断した。しかしもう一つの DMT 様配列は独立したクレードを形成し、同クレードに属する他の動物の配列もすべて未報告の配列であった。この DMT と配列の類似性があり、かつ新規のタンパク質を、DMT に関連した何らかのタンパク質であるとして、DMT-related protein (DMTRP) と命名した。DMTRP は DMT と同じく 12 か所の膜貫通部位を持つことが予測され、また機能に重要とされるアミノ酸残基も同様に保存されていた。推測された立体構造も大きな違いは見られなかった。興味深いことに、DMTRP を持つ生物はすべて海産動物であり、淡水や陸上で生活する動物からは DMTRP は検出されなかった。

DMTRP の構造・機能

第四章において DMT および DMTRP の機能を、動物の膜輸送体の機能研究によく用いられるアフリカツメガエル卵母細胞の発現系を用いて、電気生理学的手法で解明しようと試みたが、明確な結果が得られず、次に植物の DMT 研究で例がある酵母の実験系での機能解析を試みた。重金属を添加した培養液中で培養したオニヒトデ DMT および DMTRP

を発現させた酵母の細胞内金属量を ICP-MS によって測定することにより推定した結果、オニヒトデ DMT は既報の DMT と類似した機能、すなわちマンガン・鉛を有意に取込み、鉄・亜鉛・カドミウム・銅の細胞内濃度が増加する傾向が見られた。一方 DMTRP は、特に亜鉛の細胞内濃度が有意に低下し、鉄・カドミウムの細胞内濃度を減少させる傾向が見られた。このことより、DMT と DMTRP は異なる機能を持つことが明らかとなった。スポットアッセイの結果も、DMT と DMTRP の機能が全く異なることを支持していた。しかし、第二章における構造解析の結果、ApDMT と ApDMTRP の構造には膜貫通部位・intron の位置、consensus transport motif の位置と配列・機能に重要なアミノ酸残基など共通性は高く、立体構造もよく保存されていた。このことより、ApDMT と ApDMTRP の機能の違いは、一次構造や三次構造からは推測できなかった未知のアミノ酸残基や立体構造に由来すると考えられた。

また、第一章において、シチヨウシンカイヒバリガイにおいて DMTRP の発現が非常に少ないことが予想された。このことに関して、シチヨウシンカイヒバリガイと同じイガイ科の二枚貝に属するヨーロッパイガイ *Mytilus edulis* やミドリイガイ *Perna viridis* は、亜鉛の同化効率が悪く、損失速度が速いことが報告されている (Samuel & Rainbow, 2005)。このために同じ環境条件であってもフジツボの 40~100 倍程度しか亜鉛を濃縮しないと報告されており、このことが、DMTRP の発現が非常に低いことと関係しているのではないかと考えられた。

DMTRP は海洋環境適応に必要なか？

第三章における分子系統解析の結果、DMTRP を持つ生物は全て海産動物であった。さらに DMTRP は、同じ腹足綱であっても、海産腹足綱であるカサガイからは検出されなかったにもかかわらず、淡水産腹足綱である淡水産ヒラマキガイ及びスクミリンゴガイからは検出されなかった。このことから、DMTRP は海洋環境への適応に関わる遺伝子であると考えられた。しかし第三章の考察でも述べたように、海洋環境に生息しているホタテガイ・甲殻類・魚類からは DMTRP は検出されなかったことから、DMTRP の保持は海産動物にとって必須条件ではなく、従って DMTRP は海で生存するために必須のタンパク質ではない、ということが考えられた。

DMT 様配列と環境適応

哺乳類においては、DMT (Nramp2) と同じファミリーに属する Nramp1 が遺伝子重複によって生じており、免疫に関与していることが示唆されている (Blackwell et al., 2000)。

また、魚類においては全ゲノム重複 3R において SLC11A2- α と SLC11A2- β が生じ、これらも免疫に関与していることが示されている (Neves et al., 2011)。また本研究により、ホタテガイからは DMTRP は検出されず、しかしゲノム上にタンデムに存在する 2 つの DMT 様配列を保持していることが明らかとなった。豊原ら (Toyohara et al., 2005) によると、このうちの片方であるホタテガイ DMT は他の生物では輸送が確認されていない、カルシウムイオンの輸送を行っていることが電気生理学的アプローチによって示唆された。また植物においては、植物においても Nramp ファミリーは独特の進化を遂げており、例えばセイヨウアブラナは Nramp 遺伝子を 6 つ (Thomine et al., 2000)、コメは 7 つの Nramp ファミリーに属する遺伝子を保持しており (Belouchi et al., 1997)、これらは発現場所や機能が異なることが報告されている (Lanquar et al., 2005, 2010, Takahashi et al., 2011)。このように、生物は DMT 様配列を多用に変化させることで、多様な環境に適応してきた可能性が考えられた。

DMTRP の誕生と消失

DMT と DMTRP は構造上の類似性が高く、共通の祖先遺伝子の重複によって誕生した可能性が高い。重複が染色体重複または染色体の部分重複によって生じたとすれば、その痕跡は近隣遺伝子の類似性 (シンテニー) として残っている可能性がある。そこで、本研究ではオニヒトデ・ムラサキウニ・ヨーロッパヒトデのゲノム上の DMT および DMTRP の位置と周辺遺伝子の比較を行った (図考-1.)。オニヒトデの DMT と DMTRP は同一の scaffold 上に位置していたが、両者の距離は 900 kb 以上と、とても離れていた。ウニ・ヨーロッパヒトデの DMT および DMTRP はそれぞれ別の scaffold、あるいは染色体上に位置していた。このことより、最近の縦列重複によって両者が生じた可能性は否定され、オニヒトデにおいて同一染色体に乗っているのは、染色体融合、あるいは同一染色体上への転座が偶然起こった可能性が考えられた。DMT あるいは DMTRP 近傍の遺伝子は共通したものは殆ど見られず、DMTRP が染色体重複で生じた遺伝子であるとしても、その起源はとても古いことが考えられた。

分子系統解析からも、DMTRP の起源を明らかにすることを試みた。第三章において実施した分子系統解析で利用した生物および得られた結果を、動物の系統関係上に示した図を示す (図考-2)。今回利用可能だったデータベースから得られた情報の限りでは、DMTRP は動物細胞に最も近縁である襟鞭毛虫では検出されず、カイメンから検出されたことより、動物の進化の、かなり早い段階で誕生した遺伝子であることが明らかとなった。この仮説は前述の、ゲノム上の位置情報から考えられる推測と一致した。

一方、サンゴ *Acropora digitifera*・線虫 *Caenorhabditis elegans* やガザミ *Portunus trituberculatus*・ヒト *Homo sapiens* やストライプドバス *Morone saxatilis* に代表される刺胞動物門・脱皮動物・脊椎動物亜門において、複数回独立した DMTRP の消失イベントが起こっていることが明らかとなった。現在 DMTRP を保持している生物は全て海産動物であるが、サンゴ（刺胞動物門）、ヤツメウナギ *Petromyzon marinus*（海水魚）、タテジマフジツボ *Amphibalanus amphitrite*（海産甲殻類）が持っていないことから明らかなように、DMTRP の保持が海洋環境適応において必須なわけではない。一方、DMTRP を消失した生物の系統から、例えば脱皮動物から昆虫や淡水性・陸上性の線虫、脊椎動物から淡水魚や陸生四肢動物、淡水適応・陸上進出を為し得た生物が出現している。このことより、本研究において明らかとなった DMTRP の機能である、細胞内の、特に亜鉛の濃度を低下させるという機能が、海洋以外の環境への適応には不必要であったと考えられる。

同じ腹足綱に属しながら、海産動物であるカサガイ *Lottia gigantea* からは DMTRP が検出されたが、淡水産ヒラマキガイ *Biomphalaria glabrata* やスクミリンゴガイ *Pomacea canaliculata* からは DMTRP が検出されなかったことも、DMTRP が海洋環境以外である淡水への適応に不要、あるいは存在が有害である可能性を示唆している。

DMTRP は生物の陸上進出の「進化的足かせ」である

本研究において、DMTRP は細胞内亜鉛濃度を低下させる働きを持つことが示唆された。この結果より細胞内亜鉛濃度の調節機構は、海洋環境適応において必要で、海洋環境以外への適応に不必要な機能であると考えられた。亜鉛は、いくつかの生理機能に必須の金属である一方、細胞内濃度が上昇すると毒性を示す（Formigari, 2007）。また、亜鉛は陸上や淡水環境中よりも、海洋環境中において豊富であることが知られている（Neff, J. M. 2002）。このため、海洋環境中では、淡水中や陸上に比べて細胞内の亜鉛濃度を適正範囲内に維持する努力が必要であると考えられる。鉄と亜鉛の鉛直分布は海の深度とともに増加するが、ほとんどの場所で亜鉛濃度は鉄濃度よりも高く、最大で 10 倍の差がある（Obata et al., 2017）。また、海洋中の亜鉛濃度は真核生物が出現して以来、あるいはそれ以前から、現在と同程度のレベルで維持されてきた（Scott et al., 2013）。したがって、DMTRP は、生物にとって有害な濃度で自然に存在する金属を排出したり、取り込まないようにしたりすることで、特定の金属、特に亜鉛の濃度を調節していると考えられた。また、これらの金属取り込み制御は、環境水中の金属イオンの取り込みだけでなく、消化管における食物からの金属取り込みの調節にもかかわっている可能性がある。

前述の通り分子系統解析（図 3-2；考-2）の結果、進化的な観点から、脊椎動物や昆虫の

系統から DMTRP 遺伝子が消滅したのは、独立したイベントが複数回生じたことによることがわかった。DMTRP はナメクジウオからは検出されたが、進化の過程で海洋環境以外への進出経験のないであるヌタウナギ (Glover & Weinrauch, 2019) からは検出されなかった。このことから、DMTRP の消失は、淡水に移行する前の脊椎動物の祖先で起こったと考えられた。また、DMTRP は海産の甲殻類や昆虫にも存在しないことから、その消失は節足動物に共通していると考えられる。さらに、線虫 *Caenorhabditis elegans* では DMTRP が検出されないことから、DMTRP の消失は脱皮動物の祖先で起こったことが示唆された。いずれにしても、本研究の結果は、淡水および陸生動物が DMTRP を持たない系統のみの子孫であることを示唆している。DMTRP は前述の通り、発現により細胞内の、特に亜鉛の濃度を低下させる機能を持つため、この機能が進化的に、淡水・陸上進出における障害となっており、動物を海洋環境に限定している、生物の陸上進出における「進化的足かせ」であると考えられる。

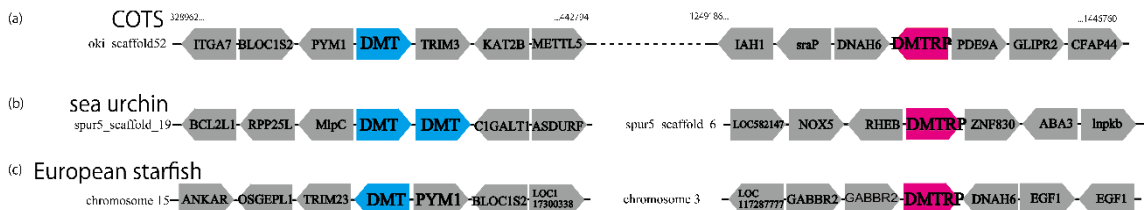
海洋動物と亜鉛制御

本研究により、DMTRP は特定の金属、特に亜鉛の細胞内濃度を調節していると考えられたが、前述の通り、DMTRP の保持が海洋環境適応において必須なわけではない。それでは、DMTRP を持たない海産動物は、亜鉛の制御をどのように行っているのだろうか。亜鉛に特化した輸送体は、特に脊椎動物において細胞質へ亜鉛を取り込む SLC39s/ZIPs が 14 種、逆に細胞質から排出する SLC30s/ZnTs が 10 種知られている (Baltaci & Yuce, 2018)。DMTRP が失われた海産生物においては、これらの分子をより高度に活用して DMTRP の亜鉛調節機能を補っている可能性がある。

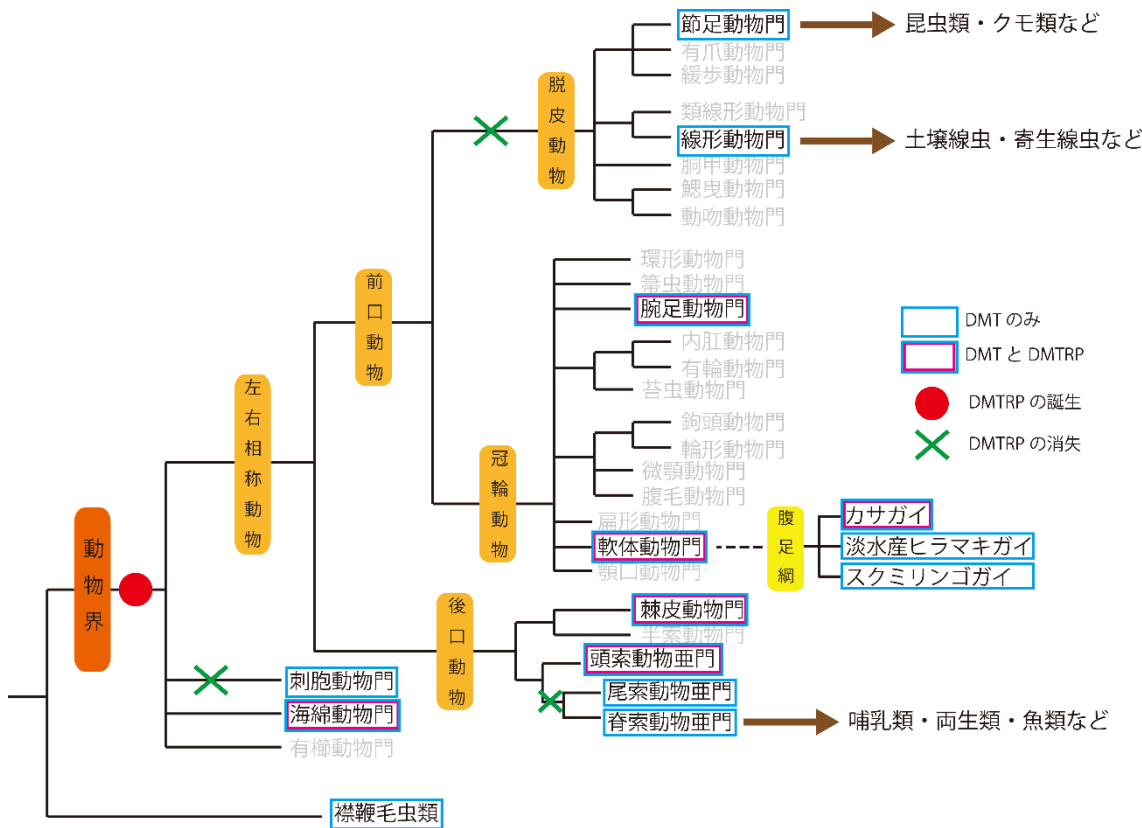
「DMT 様配列と環境適応」の項において述べたように、一部の生物では DMT を別途複製して、DMTRP の機能を代替させている可能性がある。またそれ以外に、DMTRP を喪失した生物においてその機能を代替している分子の候補として、メタロチオネインがある。メタロチオネインとは、金属と結合し、その濃度を許容範囲まで下げる機能を持つことが知られるタンパク質である (Kimura & Kambe, 2016)。メタロチオネインは多くの生物において保持されており、メタロチオネインファミリーと呼ばれる大きなグループを構成している。メタロチオネインの存在が確認されている動物門を、Ziller & Fraissinet-Tachet (2018) より改変し、DMT および DMTRP を持つ動物門とまとめた (図考-3)。この図からわかるように、DMT のみを保持し DMTRP を保持しない生物、例えば節足動物や線形動物、脊椎動物はメタロチオネインを保有している。このことから、DMTRP を持たないが海洋環境中に豊富に存在している線虫や甲殻類、魚類は、メタロチオネインによって、DMTRP の機能

を代替させることで海洋環境へ適応しているのかもしれない。

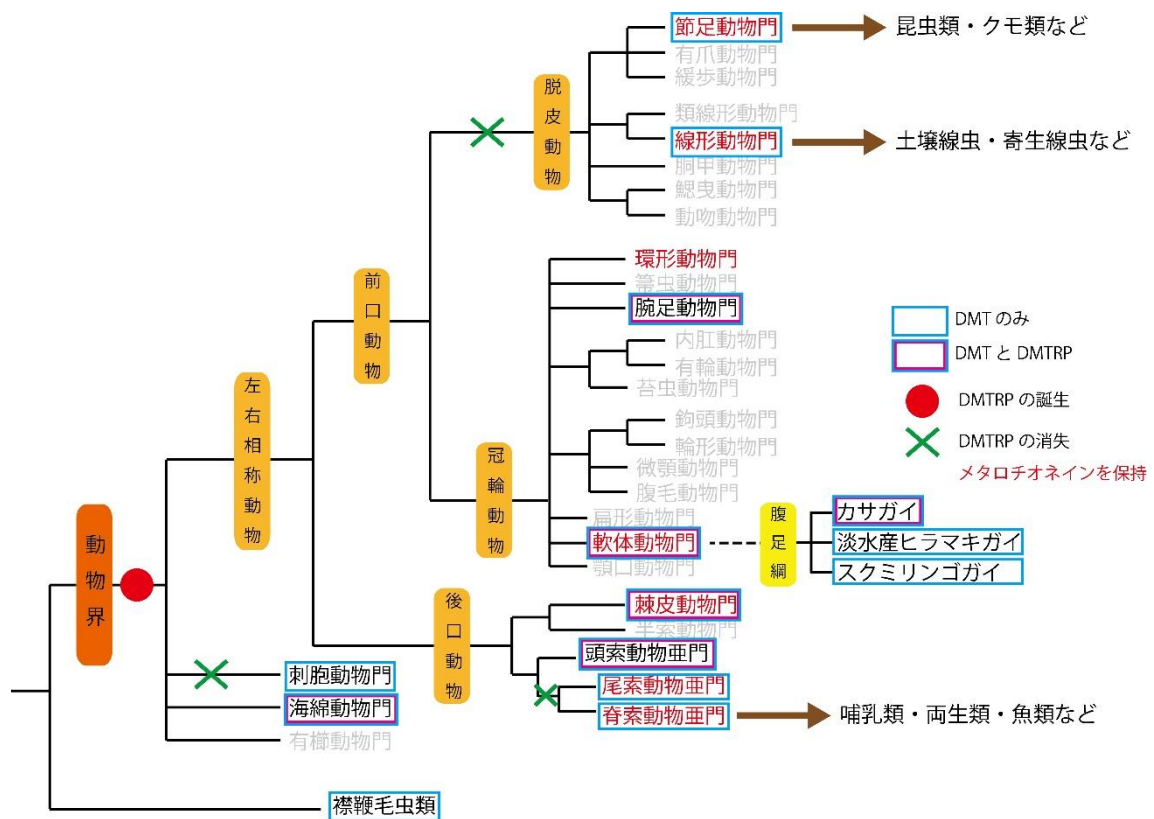
以上のように、海産動物に特異的な新規金属輸送体様タンパク質を発見し、その進化過程や機能を解明した本研究は、海洋環境における金属制御の意義、および海洋環境への理解を深める一助となり得ると考えられる。



図考-1. オニヒトデ・ムラサキウニ・ヨーロッパヒトデのゲノム上の DMT および DMTRP の位置。



図考-2. 分子系統解析で使った生物および得られた結果を、動物の系統関係上に示した図。



図考-3. メタロチオネインの保持が確認されている動物門を図考-3.上に示した図。

謝辭

謝辞

本研究を行うにあたり、研究生の頃から十年近くの長きにわたり丁寧にご指導いただき、またたくさんの挑戦の機会を与え続けてくださった、東京大学大学院新領域創成科学研究科／東京大学大気海洋研究所分子海洋生物学分野の井上広滋教授に心より感謝申し上げます。

同研究室の新里宙也准教授には、本論文の審査だけでなく、研究に関するたくさんのアドバイスを、場や人のご紹介をいただきました。高木俊幸助教には、特に酵母を用いた実験に関し、数えきれないほど多くの綿密な助言やご指導を賜りました。

また、同研究室に在籍しておられました日下部郁美博士には、実験に関する様々な助言をいただきました。角村梓博士には、実験に関するたくさんの細やかな指導をいただきました。遠藤博寿博士には、実験計画の構築に欠かせない適格な助言をいただきました。吉田愛美博士には、実験に関する様々なテクニックを教授していただきました。馬淵浩司博士には、分子系統解析に関する様々なご助言を賜りました。

東京大学大気海洋研究所底生生物分野の小島茂明教授には本論文の審査だけでなく、修士課程在籍時より、副査として貴重なご助言を多く頂きました。瀬尾絵理子博士には、二枚貝類に関する生態的・解剖学的多くの助言をいただきました。

東京大学大気海洋研究所生理学分野の神田真司准教授には、アフリカツメガエル卵母細胞を用いた電気生理学実験に関して、機材の提供をはじめとし、多くの丁寧なご指導・ご助言を賜りました。

東京大学大気海洋研究所国際沿岸海洋研究センターの白井厚太郎准教授には、本論文の審査だけでなく、試料の金属分析に関してたくさんのご指導・ご助言を賜りました。杉原奈央子博士には、実際のサンプルの解析に関しまして多大なご尽力を賜りました。

新江ノ島水族館の根本卓氏には、航海中生物の管理をしていただいただけでなく、水族館にてシチヨウシンカイヒバリガイを預かっていただきました。

日本大学生物資源科学部海洋生物資源科学科の小糸智子専任講師には、シチヨウシンカイヒバリガイの提供をしていただきました。

レディング大学の Ihsan Ullah 博士、ウィスコンシン大学マディソン校の David J. Eide 博士には、貴重な酵母の変異株系統ならびに、実験立ち上げに際しコントロール用にカカオ Nramp のコンストラクトのご提供をいただきました。

沖縄科学技術大学院大学の座安佑奈博士には、オニヒトデの維持管理および輸送の補助をしていただきました。

サンプルの採集にあたっては、海洋研究開発機構の調査研究船「なつしま」「かいよう」

の各船長および乗務員のみなさま、無人探査船「ハイパードルフィン」の運航チームのみなさま、NT14-06 航海、KY15-07 航海の各乗船研究者および学生のみなさまに、大変お世話になりました。

東京大学新領域創成科学研究科の奈良一秀教授には、本論文の審査だけでなく、修士課程時代から、研究に関する貴重なアドバイスを賜りました。

惜しめない協力をいただきました以上の方々に、この文面を借りて心より御礼申し上げます。

また、研究で関わった以上の方々だけでなく、長年の研究生活を支えてくださった同研究室のメンバーと、東京大学大気海洋研究所という素晴らしい研究機関において研究を行えましたことに、心より感謝申し上げます。

なお、本研究遂行にあたり、日本科学協会の笹川科学研究助成による助成を受けました(研究番号：28-755)。感謝いたします。

最後に、博士課程に進学することに賛成し、応援してくれた父・昌樹と母・雅子に心から感謝します。また、いかなる時も励まし、支えてくれた夫・貢一がいなければ何もできませんでした。集中力が切れそうになるとお腹の中から蹴り飛ばして喝をいれ、産まれてきてからはたくさんの笑顔で私の活力となってくれた、そしてたくさんの我慢をしてくれた息子・晃道に心から感謝いたします。

引用文献

- Ashkenazy, H., Erez, E., Martz, E., Pupko, T., & Ben-Tal, N. (2010) . ConSurf 2010: Calculating evolutionary conservation in sequence and structure of proteins and nucleic acids. *Nucleic Acids Research*, *38* (SUPPL. 2) , W529–W533.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkq399>
- Bai, X., Chen, X., Fen, Z., Wu, D., Hou, K., Cheng, G., & Peng, L. (2004) . Expression of EGFP/SDCT1 fusion protein, subcellular localization signal analysis, tissue distribution and electrophysiological function study. *Science in China, Series C: Life Sciences*, *47* (6) , 530–539. <https://doi.org/10.1360/03yc0044>
- Baltaci, A. K., & Yuce, K. (2018) . Zinc Transporter Proteins. In *Neurochemical Research* (Vol. 43, Issue 3, pp. 517–530) . Springer New York LLC.
<https://doi.org/10.1007/s11064-017-2454-y>
- Baughman, K. W. (2018) . The Crown-of-Thorns Starfish: From Coral Reef Plague to Model System. In *Results and Problems in Cell Differentiation* (Vol. 65, pp. 547–568) . Springer Verlag. https://doi.org/10.1007/978-3-319-92486-1_24
- Belouchi, A., Kwan, T., & Gros, P. (1997) . Cloning and characterization of the OsNramp family from *Oryza sativa*, a new family of membrane proteins possibly implicated in the transport of metal ions. *Plant Molecular Biology*, *33* (6) , 1085–1092.
<https://doi.org/10.1023/A:1005723304911>
- Bertoni, M., Kiefer, F., Biasini, M., Bordoli, L., & Schwede, T. (2017) . Modeling protein quaternary structure of homo- and hetero-oligomers beyond binary interactions by homology. *Scientific Reports*, *7* (1) , 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09654-8>
- Beyer, J., Green, N. W., Brooks, S., Allan, I. J., Ruus, A., Gomes, T., Bråte, I. L. N., & Schøyen, M. (2017) . Blue mussels (*Mytilus edulis* spp.) as sentinel organisms in coastal pollution monitoring: A review. In *Marine Environmental Research* (Vol. 130, pp. 338–365) . Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2017.07.024>
- Bienert, S., Waterhouse, A., De Beer, T. A. P., Tauriello, G., Studer, G., Bordoli, L., & Schwede, T. (2017) . The SWISS-MODEL Repository-new features and functionality. *Nucleic Acids Research*, *45* (D1) , D313–D319.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkw1132>
- Blackwell, J. M., Searle, S., Goswami, T., & Miller, E. N. (2000) . Understanding the multiple functions of Nramp1. In *Microbes and Infection* (Vol. 2, Issue 3, pp. 317–321) . [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(00\)00295-1](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(00)00295-1)

- Bozzi, A. T., Bane, L. B., Weihofen, W. A., McCabe, A. L., Singharoy, A., Chipot, C. J., Schulten, K., & Gaudet, R. (2016) . Conserved methionine dictates substrate preference in Nramp-family divalent metal transporters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *113* (37) , 10310–10315. <https://doi.org/10.1073/pnas.1607734113>
- Bozzi, A. T., Bane, L. B., Weihofen, W. A., Singharoy, A., Guillen, E. R., Ploegh, H. L., Schulten, K., & Gaudet, R. (2016) . Crystal Structure and Conformational Change Mechanism of a Bacterial Nramp-Family Divalent Metal Transporter. *Structure*, *24* (12) , 2102–2114. <https://doi.org/10.1016/j.str.2016.09.017>
- Caballes, C. F., & Pratchett, M. S. (2017) . Environmental and biological cues for spawning in the crown-of-thorns starfish. *PLoS ONE*, *12* (3) , e0173964. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173964>
- Cabantchik, Z. I., Breuer, W., Zanninelli, G., & Cianciulli, P. (2005) . LPI-labile plasma iron in iron overload. In *Best Practice and Research: Clinical Haematology* (Vol. 18, Issue 2 SPEC. ISS., pp. 277–287) . Bailliere Tindall Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.beha.2004.10.003>
- Capella-Gutiérrez, S., Silla-Martínez, J. M., & Gabaldón, T. (2009) . trimAl: A tool for automated alignment trimming in large-scale phylogenetic analyses. *Bioinformatics*, *25* (15) , 1972–1973. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp348>
- Cellier, M., Privé, G., Belouchi, A., Kwan, T., Rodrigues, V., Chia, W., & Gros, P. (1995) . Nramp defines a family of membrane proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *92* (22) , 10089–10093. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.22.10089>
- Celniker, G., Nimrod, G., Ashkenazy, H., Glaser, F., Martz, E., Mayrose, I., Pupko, T., & Ben-Tal, N. (2013) . ConSurf: Using evolutionary data to raise testable hypotheses about protein function. In *Israel Journal of Chemistry* (Vol. 53, Issues 3–4, pp. 199–206) . John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/ijch.201200096>
- Company, R., Serafim, A., Cosson, R. P., Fiala-Médioni, A., Camus, L., Serrão-Santos, R., & João Bebianno, M. (2010) . Sub-lethal effects of cadmium on the antioxidant defence system of the hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus azoricus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *73* (5) , 788–795. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.01.003>
- Dascal, N. (2000) . Voltage Clamp Recordings from *Xenopus* Oocytes. *Current Protocols*

- in Neuroscience*, 10 (1) , 6.12.1-6.12.20.
<https://doi.org/10.1002/0471142301.ns0612s10>
- Devi, V. U. (1996) . Bioaccumulation and metabolic effects of cadmium on marine fouling
 dressinid bivalve, *Mytilopsis sallei* (recluz) . *Archives of Environmental
 Contamination and Toxicology*, 31 (1) , 47–53. <https://doi.org/10.1007/bf00203906>
- Ehrnstorfer, I. A., Geertsma, E. R., Pardon, E., Steyaert, J., & Dutzler, R. (2014) .
 Crystal structure of a SLC11 (NRAMP) transporter reveals the basis for
 transition-metal ion transport. *Nature Structural and Molecular Biology*, 21 (11) ,
 990–996. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2904>
- Formigari, A. (2007) . Zinc, antioxidant systems and metallothionein in metal mediated-
 apoptosis: biochemical and cytochemical aspects. *Comp. Biochem. C*, 146, 443–459.
- Glover, C. N., & Weinrauch, A. M. (2019) . The good, the bad and the slimy:
 Experimental studies of hagfish digestive and nutritional physiology. In *Journal of
 Experimental Biology* (Vol. 222, Issue 14, p. jeb190470) . Company of Biologists
 Ltd. <https://doi.org/10.1242/jeb.190470>
- Guan, B., Chen, X., & Zhang, H. (2013) . Two-electrode voltage clamp. *Methods in
 Molecular Biology*, 998, 79–89. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-351-0_6
- Guex, N., Peitsch, M. C., & Schwede, T. (2009) . Automated comparative protein
 structure modeling with SWISS-MODEL and Swiss-PdbViewer: A historical
 perspective. *Electrophoresis*, 30 (SUPPL. 1) , S162–S173.
<https://doi.org/10.1002/elps.200900140>
- Gunshin, H., Mackenzie, B., Berger, U. V., Gunshin, Y., Romero, M. F., Boron, W. F.,
 Nussberger, S., Gollan, J. L., & Hediger, M. A. (1997) . Cloning and
 characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature*, 388
 (6641) , 482–488. <https://doi.org/10.1038/41343>
- Hall, M. R., Kocot, K. M., Baughman, K. W., Fernandez-Valverde, S. L., Gauthier, M. E. A.,
 Hatleberg, W. L., Krishnan, A., McDougall, C., Motti, C. A., Shoguchi, E., Wang, T.,
 Xiang, X., Zhao, M., Bose, U., Shinzato, C., Hisata, K., Fujie, M., Kanda, M.,
 Cummins, S. F., ... Degnan, B. M. (2017) . The crown-of-thorns starfish genome as a
 guide for biocontrol of this coral reef pest. *Nature*, 544 (7649) , 231–234.
<https://doi.org/10.1038/nature22033>
- Hardivillier, Y., Denis, F., Demattei, M. V., Bustamante, P., Laulier, M., & Cosson, R.

- (2006) . Metal influence on metallothionein synthesis in the hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus thermophilus*. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, *143* (3) , 321–332.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2006.03.006>
- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L., & deWaard, J. R. (2003) . Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, *270* (1512) , 313–321.
<https://doi.org/10.1098/RSPB.2002.2218>
- Hebert, P. D. N., Ratnasingham, S., & Waard, J. R. de. (2003) . Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, *270* (SUPPL. 1) .
<https://doi.org/10.1098/RSBL.2003.0025>
- Inoue, K., Yoshioka, Y., Tanaka, H., Kinjo, A., Sassa, M., Ueda, I., Shinzato, C., Toyoda, A., & Itoh, T. (2021) . Genomics and Transcriptomics of the green mussel explain the durability of its byssus. *Scientific Reports*, *11* (1) . <https://doi.org/10.1038/s41598-021-84948-6>
- Käll, L., Krogh, A., & Sonnhammer, E. L. L. (2004) . A combined transmembrane topology and signal peptide prediction method. *Journal of Molecular Biology*, *338* (5) , 1027–1036. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.03.016>
- Katoh, K., Rozewicki, J., & Yamada, K. D. (2018) . MAFFT online service: Multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Briefings in Bioinformatics*, *20* (4) , 1160–1166. <https://doi.org/10.1093/bib/bbx108>
- 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. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst010>
- Kimura, T., & Kambe, T. (2016) . The functions of metallothionein and ZIP and ZnT transporters: An overview and perspective. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 17, Issue 3, p. 336) . MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms17030336>
- King, N., Westbrook, M. J., Young, S. L., Kuo, A., Abedin, M., Chapman, J., Fairclough, S., Hellsten, U., Isogai, Y., Letunic, I., Marr, M., Pincus, D., Putnam, N., Rokas, A., Wright, K. J., Zuzow, R., Dirks, W., Good, M., Goodstein, D., ... Rokhsar, D. (2008) . The genome of the choanoflagellate *Monosiga brevicollis* and the origin of metazoans.

- Nature*, **451** (7180) , 783–788. <https://doi.org/10.1038/nature06617>
- Koschinsky, A., Kausch, M., & Borowski, C. (2014) . Metal concentrations in the tissues of the hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus*: Reflection of different metal sources. *Marine Environmental Research*, **95**, 62–73.
<https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2013.12.012>
- Lanquar, V., Lelièvre, F., Bolte, S., Hamès, C., Alcon, C., Neumann, D., Vansuyt, G., Curie, C., Schröder, A., Krämer, U., Barbier-Brygoo, H., & Thomine, S. (2005) . Mobilization of vacuolar iron by AtNRAMP3 and AtNRAMP4 is essential for seed germination on low iron. *EMBO Journal*, **24** (23) , 4041–4051.
<https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600864>
- Lanquar, V., Ramos, M. S., Lelièvre, F., Barbier-Brygoo, H., Krieger-Liszkay, A., Krämer, U., & Thomine, S. (2010) . Export of vacuolar manganese by AtNRAMP3 and AtNRAMP4 is required for optimal photosynthesis and growth under manganese deficiency. *Plant Physiology*, **152** (4) , 1986–1999.
<https://doi.org/10.1104/pp.109.150946>
- Li, Y., Zhang, X., Meng, J., Chen, J., You, X., Shi, Q., & Wang, W. X. (2020) . Molecular responses of an estuarine oyster to multiple metal contamination in Southern China revealed by RNA-seq. *Science of the Total Environment*, **701**, 134648.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134648>
- Ling, S. D., Cowan, Z. L., Boada, J., Flukes, E. B., & Pratchett, M. S. (2020) . Homing behaviour by destructive crown-of-thorns starfish is triggered by local availability of coral prey. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **287** (1938) .
<https://doi.org/10.1098/rspb.2020.1341>
- Lucas, J. S. (2013) . *Crown-of-thorns starfish*. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.07.080>
- Marchant, J. S. (2018) . Heterologous protein expression in the xenopus oocyte. *Cold Spring Harbor Protocols*, **2018** (4) , 253–257. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot096990>
- Marciani, P., Trotti, D., Hediger, M. A., & Monticelli, G. (2004) . Modulation of DMT1 Activity by Redox Compounds. *Journal of Membrane Biology*, **197** (2) , 91–99.
<https://doi.org/10.1007/s00232-003-0644-9>
- Migliaccio, O., Castellano, I., Cirino, P., Romano, G., & Palumbo, A. (2015) . Maternal exposure to cadmium and manganese impairs reproduction and progeny fitness in the sea urchin *Paracentrotus lividus*. *PLoS ONE*, **10** (6) , e0131815.

- <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131815>
- Migliaccio, O., Castellano, I., Romano, G., & Palumbo, A. (2014) . Stress response to cadmium and manganese in *Paracentrotus lividus* developing embryos is mediated by nitric oxide. *Aquatic Toxicology*, *156*, 125–134.
<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.08.007>
- M Kalay, M. C. (2000) . Elimination of essential (Cu, Zn) and non-essential (Cd, Pb) metals from tissues of a freshwater fish *Tilapia zilli*. *Turk. J. Zool.*, *24*, 429–436.
- Moore, C. M., Mills, M. M., Arrigo, K. R., Berman-Frank, I., Bopp, L., Boyd, P. W., Galbraith, E. D., Geider, R. J., Guieu, C., Jaccard, S. L., Jickells, T. D., La Roche, J., Lenton, T. M., Mahowald, N. M., Marañón, E., Marinov, I., Moore, J. K., Nakatsuka, T., Oschlies, A., ... Ulloa, O. (2013) . Processes and patterns of oceanic nutrient limitation. In *Nature Geoscience* (Vol. 6, Issue 9, pp. 701–710) .
<https://doi.org/10.1038/ngeo1765>
- Muralidharan, S., Thompson, E., Raftos, D., Birch, G., & Haynes, P. A. (2012) . Quantitative proteomics of heavy metal stress responses in Sydney rock oysters. *Proteomics*, *12* (6) , 906–921. <https://doi.org/10.1002/pmic.201100417>
- Myint, Z. W., Oo, T. H., Thein, K. Z., Tun, A. M., & Saeed, H. (2018) . Copper deficiency anemia: review article. In *Annals of Hematology* (Vol. 97, Issue 9, pp. 1527–1534) . Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00277-018-3407-5>
- Neves, J. V., Wilson, J. M., Kuhl, H., Reinhardt, R., Castro, L. F. C., & Rodrigues, P. N. S. (2011) . Natural history of SLC11 genes in vertebrates: Tales from the fish world. *BMC Evolutionary Biology*, *11* (1) , 106. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-11-106>
- Nevo, Y., & Nelson, N. (2006) . The NRAMP family of metal-ion transporters. In *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* (Vol. 1763, Issue 7, pp. 609–620) . <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.05.007>
- Nielsen, K. H. (2014) . Protein expression-yeast. In *Methods in Enzymology* (Vol. 536, pp. 133–147) . Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420070-8.00012-X>
- Nishimura, K., Fukagawa, T., Takisawa, H., Kakimoto, T., & Kanemaki, M. (2009) . An auxin-based degron system for the rapid depletion of proteins in nonplant cells. *Nature Methods*, *6* (12) , 917–922. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1401>
- O'Neal, S. L., & Zheng, W. (2015) . Manganese Toxicity Upon Overexposure: a Decade in

- Review. In *Current environmental health reports* (Vol. 2, Issue 3, pp. 315–328) . Springer. <https://doi.org/10.1007/s40572-015-0056-x>
- Obata, H., Nishioka, J., Kim, T., Norisuye, K., Takeda, S., Wakuta, Y., & Gamo, T. (2017) . Dissolved iron and zinc in Sagami Bay and the Izu-Ogasawara Trench. *Journal of Oceanography*, 73 (3) , 333–344. <https://doi.org/10.1007/s10872-016-0407-8>
- Okubo, M., Yamada, K., Hosoyamada, M., Shibasaki, T., & Endou, H. (2003) . Cadmium transport by human Nramp 2 expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 187 (3) , 162–167. [https://doi.org/10.1016/S0041-008X\(02\)00078-9](https://doi.org/10.1016/S0041-008X(02)00078-9)
- Ole Folmer, Michael B Black, & Hoeh Wr. (1994) . DNA primers for amplification of mitochondrial Cytochrome C oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* , 3, 294–299. https://www.researchgate.net/publication/15316743_DNA_primers_for_amplification_of_mitochondrial_Cytochrome_C_oxidase_subunit_I_from_diverse_metazoan_invertebrates
- Qin, L., Han, P., Chen, L., Walk, T. C., Li, Y., Hu, X., Xie, L., Liao, H., & Liao, X. (2017) . Genome-wide identification and expression analysis of NRAMP family genes in soybean (Glycine max L.) . *Frontiers in Plant Science*, 8, 1436. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01436>
- Radisky, D., & Kaplan, J. (1999) . Regulation of transition metal transport across the yeast plasma membrane. In *Journal of Biological Chemistry* (Vol. 274, Issue 8, pp. 4481–4484) . American Society for Biochemistry and Molecular Biology Inc. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.8.4481>
- Richer, E., Courville, P., Bergevin, I., & Cellier, M. F. M. (2003) . Horizontal Gene Transfer of “Prototype” Nramp in Bacteria. *Journal of Molecular Evolution*, 57 (4) , 363–376. <https://doi.org/10.1007/s00239-003-2472-z>
- Sacher, A. (2001) . Properties of the mammalian and yeast metal-ion transporters DCT1 and Smf1p expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *J. Exp. Biol.*, 204, 1053.
- Samuel N Luoma and Philip S. Rainbow (2005) . Why Is Metal Bioaccumulation So Variable? Biodynamics as a Unifying Concept. *Environmental Science and Technology*, 39 (7) , 1921–1931. <https://doi.org/10.1021/ES048947E>

- Scott, C., Planavsky, N. J., Dupont, C. L., Kendall, B., Gill, B. C., Robbins, L. J., Husband, K. F., Arnold, G. L., Wing, B. A., Poulton, S. W., Bekker, A., Anbar, A. D., Konhauser, K. O., & Lyons, T. W. (2013). Bioavailability of zinc in marine systems through time. *Nature Geoscience*, 6 (2), 125–128. <https://doi.org/10.1038/ngeo1679>
- Singh, N., Yadav, K. K., & Rajasekharan, R. (2017). Effect of zinc deprivation on the lipid metabolism of budding yeast. In *Current Genetics* (Vol. 63, Issue 6, pp. 977–982). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00294-017-0704-9>
- Stamatakis, A. (2006). RAxML-VI-HPC: Maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics*, 22 (21), 2688–2690. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl446>
- Studer, G., Rempfer, C., Waterhouse, A. M., Gumienny, R., Haas, J., & Schwede, T. (2020). QMEANDisCo—distance constraints applied on model quality estimation. *Bioinformatics*, 36 (6), 1765–1771. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz828>
- Sun, J., Zhang, Y., Xu, T., Zhang, Y., Mu, H., Zhang, Y., Lan, Y., Fields, C. J., Hui, J. H. L., Zhang, W., Li, R., Nong, W., Cheung, F. K. M., Qiu, J. W., & Qian, P. Y. (2017). Adaptation to deep-sea chemosynthetic environments as revealed by mussel genomes. *Nature Ecology and Evolution*, 1 (5), 121. <https://doi.org/10.1038/s41559-017-0121>
- Takahashi, R., Ishimaru, Y., Senoura, T., Shimo, H., Ishikawa, S., Arao, T., Nakanishi, H., & Nishizawa, N. K. (2011). The OsNRAMP1 iron transporter is involved in Cd accumulation in rice. *Journal of Experimental Botany*, 62 (14), 4843–4850. <https://doi.org/10.1093/jxb/err136>
- Tandy, S., Williams, M., Leggett, A., Lopez-Jimenez, M., Dedes, M., Ramesh, B., Srai, S. K., & Sharp, P. (2000). Nramp2 expression is associated with pH-dependent iron uptake across the apical membrane of human intestinal Caco-2 cells. *Journal of Biological Chemistry*, 275 (2), 1023–1029. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.2.1023>
- Thomine, S., Wang, R., Ward, J. M., Crawford, N. M., & Schroeder, J. I. (2000). Cadmium and iron transport by members of a plant metal transporter family in Arabidopsis with homology to Nramp genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97 (9), 4991–4996. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.9.4991>
- TL Bailey, C. E. (1994). Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers. *Proc. ISMB*, 2, 28.

- Toyohara, H., Yamamoto, S., Hosoi, M., Takagi, M., Hayashi, I., Nakao, K., & Kaneko, S. (2005) . Scallop DMT functions as a Ca^{2+} transporter. *FEBS Letters*, *579* (12) , 2727–2730. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.03.082>
- Ullah, I., Wang, Y., Eide, D. J., & Dunwell, J. M. (2018) . Evolution, and functional analysis of Natural Resistance-Associated Macrophage Proteins (NRAMPs) from *Theobroma cacao* and their role in cadmium accumulation. *Scientific Reports*, *8* (1) , 14412–14415. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32819-y>
- Wang, J., Zhang, G., Fang, X., Guo, X., Li, L., Luo, R., Xu, F., Yang, P., Zhang, L., Wang, X., Qi, H., Xiong, Z., Que, H., Xie, Y., Holland, P. W. H., Paps, J., Zhu, Y., Wu, F., Chen, Y., ... Wang, J. (2012) . The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. *Nature*, *490* (7418) , 49–54. <https://doi.org/10.1038/nature11413>
- Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., Heer, F. T., De Beer, T. A. P., Rempfer, C., Bordoli, L., Lepore, R., & Schwede, T. (2018) . SWISS-MODEL: Homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Research*, *46* (W1) , W296–W303. <https://doi.org/10.1093/nar/gky427>
- Xu, Y., Feng, L., Jeffrey, P. D., Shi, Y., & Morel, F. M. M. (2008) . Structure and metal exchange in the cadmium carbonic anhydrase of marine diatoms. *Nature*, *452* (7183) , 56–61. <https://doi.org/10.1038/nature06636>
- Yap, C. K., Ismail, A., Omar, H., & Tan, S. G. (2004) . Toxicities and tolerances of Cd, Cu, Pb and Zn in a primary producer (*Isochrysis galbana*) and in a primary consumer (*Perna viridis*) . *Environment International*, *29* (8) , 1097–1104. [https://doi.org/10.1016/S0160-4120\(03\)00141-7](https://doi.org/10.1016/S0160-4120(03)00141-7)
- Yllmaz, A. B., Yanar, A., & Alkan, E. N. (2017) . Review of heavy metal accumulation on aquatic environment in Northern East Mediterranean Sea part I: Some essential metals. In *Reviews on Environmental Health* (Vol. 32, Issues 1–2, pp. 119–163) . Walter de Gruyter GmbH. <https://doi.org/10.1515/reveh-2016-0065>
- Ziller, A., & Fraissinet-Tachet, L. (2018) . Metallothionein diversity and distribution in the tree of life: a multifunctional protein. In *Metallomics* (Vol. 10, Issue 11, pp. 1549–1559) . Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/c8mt00165k>
- 井上 広滋, 小糸 智子 (2010) : 熱水噴出域への適応機構をアミノ酸輸送体から探る. 海洋と生物 *32*, 123-128

- 飯笹 幸吉、石橋 純一郎、藤原 義弘、橋本 惇、堀井 善弘、石塚 治、小山 純弘、
湯浅 真人 (1999) : 明神海丘のアクティブ熱水フィールドとブラックスモーカー,
JAMSTEC 深海研究 14, 223-236
- 大越 健嗣 (2010) : 熱水噴出域に生息する二枚貝類の元素蓄積と貝殻形成、海洋と生物、
32, 129-135
- 佐々木 猛智 (2010) : 貝類学. 東京大学出版会, pp381
- 藤倉 克則 , 丸山 正, 奥谷 喬司 (2012) : 潜水調査船が観た深海生物 深海生物研究の
現在 第2版. 東海大学出版, 神奈川, 15-16pp, 75pp, 122pp
- 西川 輝昭 (2013) : 生物の科学遺産 67: 89-94pp