

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏 名 佐々 三依子

海水には、生体にとって必須の亜鉛や銅、有害性が報告されているカドミウムや鉛など様々な微量金属が溶け込んでいる。また、必須の金属であっても、過剰量を摂取すると有害となる。そのため、海洋環境中で生命を維持するためには、必要な金属のみを必要な量だけ取り込む精密な制御が必要となる。本研究では、海産動物の金属取り込み制御機構を理解するために、二価金属イオン輸送体 (Divalent metal transporter; DMT) に着目した。DMT は、細菌から哺乳類まで多くの生物種が持つ膜輸送体タンパク質であり、哺乳類においては鉄、マンガン、亜鉛、銅、カドミウムなど広く二価金属イオンを細胞内に取り込む性質が明らかにされている。一方、海産無脊椎動物の DMT についてはこれまでほとんど研究例がなかった。

本論文は、序論、第一章から第四章および総合考察から構成される。第一章では、多様な環境に適応している二枚貝類から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 遺伝子の探索と単離および機能解析を試みた。その結果、両種から、それぞれ二つずつの DMT 様配列 (仮称 DMT-1、DMT-2) を発見し、それぞれ重金属曝露による遺伝子発現応答解析および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、明確な結果を得ることはできなかった。

第二章においては、ゲノムおよび RNA-seq データから DMT-1、DMT-2 両遺伝子の存在と発現が確認できたオニヒトデ *Acanthaster planci* を対象生物として、両遺伝子の cDNA を単離し、得られた配列がコードするアミノ酸配列を用いて膜貫通部位解析やモチーフ解析を試みた。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。その結果、両配列の構造的類似性は高く、共通の祖先遺伝子に由来する可能性が示唆された。一方、両遺伝子のゲノム上の位置を調べると、オニヒトデでは DMT-1 と DMT-2 は同一の scaffold 上に存在していたもののその距離は 900 kb 以上離れていた。また、同じ棘皮動物のヨーロッパヒトデゲノム上では両遺伝子は別の染色体上に存在していた。さらに、両種とも、DMT-1、DMT-2 の周辺遺伝子の間にシンテニーの保存性は認められなかった。以上より、両遺伝子は分岐後かなり時間が経過している可能性が示唆された。

第三章においては、両遺伝子の起源と分布をより詳細に探るため、全ゲノムが読まれている多くの生物を対象とし、データベース検索を行った。また、得られた配列を用いて分子系統解析を行った。その結果、動物の DMT 様配列は植物や微生物の DMT とは独立した集団を形成するが、そのなかで大きく二つのクレードに分かれることが明らかとなった。一方のクレードには哺乳類などの既知 DMT が含まれ、このクレードに貝やヒトデの DMT-2 も含まれた。したがって、DMT-2 は既知の動物 DMT のオルソログであると考えられた。もう一方のクレードは未知の DMT 様配列のみで構成され、そこに貝やヒトデの DMT-1 が含まれていた。そこで本クレード

に属する配列を、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。

第四章においては、オニヒトデの DMT と DMTRP の機能を、アフリカツメガエル卵母細胞に発現させての電気生理学的解析、組換え酵母を用いたスポットアッセイ、および組換え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明確な結果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。組換え酵母の金属取込量測定実験においては、DMT を発現させた酵母では、哺乳類の DMT と同様に多くの二価金属の細胞内濃度が上昇する傾向が見られたが、DMTRP を組換え発現させた酵母では、金属濃度、とくに亜鉛の細胞内濃度が低下した。すなわち、両タンパク質は、構造上の類似性が高いにもかかわらず、機能は拮抗的であることがわかった。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。また、亜鉛は淡水中よりも、海水中において豊富である。このため、海洋環境中では、淡水中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り、DMTRP はその機能を担っていると考えられた。

総合考察では、DMT と DMTRP の動物進化における意義を考察した。分子系統解析の結果は、DMTRP 遺伝子の消失が、淡水に移行する前の脊椎動物の祖先や、節足動物や線形動物を含む脱皮動物の祖先などにおいて、独立して起こったことを示している。そして、現在淡水や陸上で反映している動物群は、主にこれら DMTRP 遺伝子が消失した系統から進化したことになる。DMTRP が亜鉛の取り込みを阻害するという機能解析の結果を合わせて考察することで、本論文は、DMTRP は亜鉛が不足する淡水、ひいては陸上の環境に進出する際には障害となり、動物を海洋環境に限定する「進化的足かせ」になってきたという新しい考え方を提唱した。

以上のように、本論文は、金属取り込み制御に関わる海洋生物特異的な新規タンパク質の遺伝子を発見し、その機能を組換え実験系を用いて解明し、それらの結果から、動物の淡水や陸上への進出に関する新しい学説を提唱した。また、得られた結果は、人為由来のものを含め、環境中の金属の海洋生物への影響を考察する上でも重要な手掛かりを与えるものである。

なお、本論文第2～4章は、高木俊幸、金城梓、善岡祐輝、座安佑奈、新里宙也、神田真司、杉原奈央子、白井厚太郎、井上広滋との共同研究であるが、論文提出者が主体となって分析及び検証を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

よって本論文は博士（環境学）の学位請求論文として合格と認められる。