

海産無脊椎動物の GAT-1 が示す GABA 輸送体グループの進化の歴史

2012 年 3 月 自然環境学専攻 47106608 金城梓

指導教員 准教授 井上広滋

キーワード：GABA 輸送体グループ、GAT-1、タウリン輸送体、分子進化

1. 背景と目的

海産無脊椎動物は浅海から深海まで広く分布し、それぞれの種の特異的な環境に適応するための機能を進化の過程で獲得してきた。例えば、汽水域に棲む種は塩分濃度の変化に適応する機能を、熱水噴出域に棲む種は硫化水素の毒性に対する適応機能を進化させている。これらの環境適応機能と、その進化の歴史を知ることは、多様な海洋の生態系の保全や持続的利用のための基礎的な知見として役立つと考えられる。

近年の研究により、海産無脊椎動物である軟体動物の環境適応機構において、タウリン輸送体 (TAUT) と呼ばれる膜蛋白質が重要な役割を果たすことが明らかとなってきた (Toyohara et al. 2005; Inoue et al. 2008)。TAUT は、膜輸送体蛋白質ファミリーの一種である SLC6 (Solute Carrier 6) ファミリーの中の γ アミノ酪酸 (GABA) 輸送体 (GAT) グループに属する輸送体である (Kristensen et al. 2011)。哺乳類においては、GAT グループを構成する輸送体として、TAUT の他に 4 種類の GABA 輸送体 (GAT-1, -2, -3, -4) とクレアチン輸送体 (CT1) が確認され、それぞれ生体の恒常性維持に重要な働きを持つことが明らかになっている (Snow and Murphy. 2001; Coni et al. 2004; Kristensen et al. 2011)。一方、哺乳類以外の動物群においては、GAT グループに関する情報は極めて乏しく、これまで海産無脊椎動物において、TAUT、昆虫等において GAT-1 の存在が報告されているのみで (Mbungu et al. 1995)、ひとつの種から複数の GAT グループ輸送体が発見された例はなかった。また、哺乳類以外の情報が乏しいため、GAT グループが進化の過程において、どのようにその数と輸送基質を増やしてきたかは明らかになっていない。本研究では、GAT グループの輸送体の遺伝子の探索や、分子系統解析、また比較ゲノム解析を行い、その結果をもとに GAT グループの進化過程の考察を試みた。

2. 試料と方法

既知の GAT-1 配列の保存性の高い領域から縮重プライマーを設計し、すでに TAUT が単離されているシチヨウシンカイヒバリガイ (*Bathymodioulus septemdiarum*) とナンキョクオキアミ (*Euphausia superba*) から GAT-1 (cDNA 部分配列) を PCR により単離した。cDNA の両端の配列は RACE 法により決定した。次に、得られた cDNA がコードするアミノ酸配列と、データベースの探索により得られた様々な生物の GAT グループのアミノ酸配列の系統関係の推定を最尤法により行った。また、GAT グループの種類が最も多い脊椎動物において、それぞれの遺伝子やその周辺の遺伝子の染色体上の位置関係を調べ、GAT グループの進化過程を考察した。

3. 結果

シチヨウヒバリガイとナンキョクオキアミから昆虫やヒトの GAT-1 と高い相同性を示す cDNA をそれぞれ単離することができた。得られた配列は、分子系統解析において、それぞれの種の GAT-1 であることが支持された。TAUT と GAT-1 が前口動物の同一種から単離されたことより、両者の分化が前口・後口動物の分岐以前に起こったことが証明できた。

しかし、分子系統解析の結果は、前口動物の TAUT は、機能的には脊椎動物の TAUT と類似しているにも関わらず、遺伝子の系譜としては CT1 であることがわかった。このこと

から、前口・後口動物の共通祖先には、GAT-1 と CT1 が存在していたことが推測された。また、GAT-2~4 は、GABA との親和性が高いにも関わらず、分子系統的には GAT-1 よりも TAUT に近いことがわかった。このことは、GAT、CT、TAUT という機能上の分類は、分子進化の観点からは適当でないことを示している。

脊椎動物の GAT ファミリーの遺伝子は、染色体上に 3 つの領域にわかれて存在し、ひとつの領域には、GAT-1 遺伝子と TAUT 遺伝子と GAT-3 遺伝子、別の領域には GAT-2 遺伝子と GAT-4 遺伝子がそれぞれ縦列に並んで存在し、CT1 遺伝子は単独で存在していた。それぞれの領域の GAT ファミリー遺伝子の近隣には、同じ祖先遺伝子に由来する類似の遺伝子（パラログ）が共通して存在しており、これらの 3 つの領域が、染色体またはその一部の領域の複製により生じたことが示唆される。

4. 考察

これらの結果より、

GAT ファミリーは以下の過程で形成されたと考えられる

(図 1)。前口・後口動物の分岐前に、GAT ファミリーの共通祖先 A 遺伝子の縦列重複 (図 1-①) により、GAT-1 遺伝子とその他のメンバーの共通祖先 B 遺伝子が形成され、次に両遺伝子と近隣の遺伝子を含む領域が重複し (図 1-②)、CT1 と TAUT/GAT2~4 の共通祖先 C 遺伝子が形成した。そして、C 遺伝子から TAUT 遺伝子と、GAT2~4 の共通祖先 D 遺伝子が生じた。なお、前口動物では、TAUT 遺伝子が見つからないため、この重複が後口動物のみで生じたか、もしくは前口・後口動物の分岐前に生じたか前口動物で TAUT 遺伝子が消失しかは不明である。次に、D 遺伝子から、脊椎動物の祖先で起こった全ゲノム重複時に、GAT2/4 の共通祖先 E 遺伝子が形成し (図 1-③)、D 遺伝子は GAT-3 となった。共通祖先 E 遺伝子は、縦列重複し、それぞれ GAT-2 と GAT-4 となった。

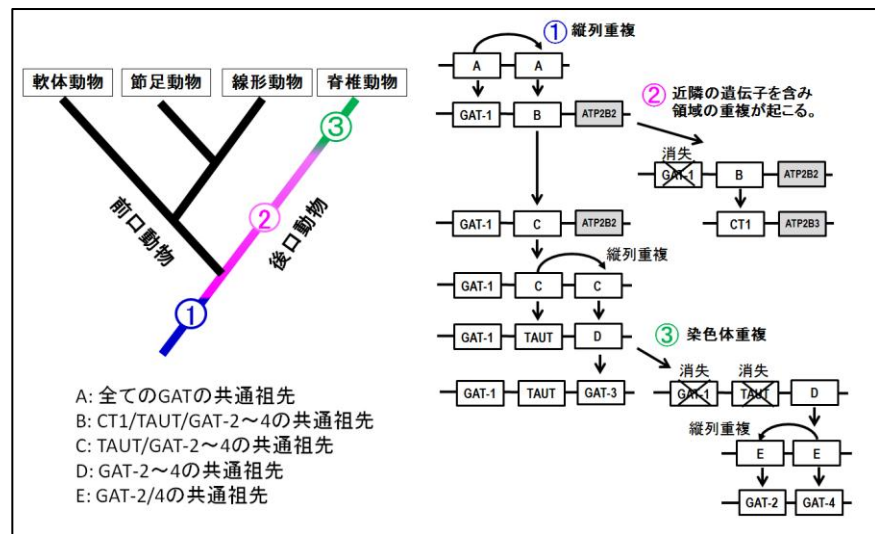


図 1. 推測された GAT グループの進化過程

本研究により、軟体・節足動物などの海産無脊椎動物において GAT-1 と CT1 (機能的には CT1 と TAUT の中間体と考えられる) の 2 種類が独立に存在することが明らかとなった。海産無脊椎動物において、これら 2 種類の輸送体の機能の違いを明らかにすることができれば、両者の機能の系譜を明確にすることができるだけでなく、海産無脊椎動物の環境適応における役割への理解につながると期待される。

次に、D 遺伝子から、脊椎動物の祖先で起こった全ゲノム重複時に、GAT2/4 の共通祖先 E 遺伝子が形成し (図 1-③)、D 遺伝子は GAT-3 となった。共通祖先 E 遺伝子は、縦列重複し、それぞれ GAT-2 と GAT-4 となった。

5. 参考文献

Conti et al. (2004). Brain Research/Brain Research Review, 45: 196-212. Inoue et al. (2008). FEBS Letters, 582: 1542-1546. Kristensen et al. (2011). Pharmacol. Rev., 63: 585-640. Mbungu et al. (1995). Biochem. Biophys., 318: 489-497. Snow and Murphy. (2001). Mol. Cell. Biochem., 224: 169-181. Toyohara et al. (2005). Fish. Sci., 71: 356-360.

Evolutionary History of the GABA Transporter Group Revealed by Marine Invertebrate GAT-1 Genes

March 2012, Department of Natural Environmental Studies, 47106608, Azusa Kinjo
Supervisor; Associate Professor, Koji, INOUE

Keywords: GABA transporter (GAT) group, GAT-1, TAUT, Molecular evolution

1. Introduction and Purpose

Marine invertebrates have evolved special adaptation mechanisms that allow them wide distribution in the world's oceans, from shallow to deep waters. For instance, species in shallow water and those in hydrothermal vents have evolved adaptations to cope with salinity change and sulfide-rich environment, respectively. The deeper understanding of such adaptation mechanisms and their evolutionary histories of marine invertebrates will provide useful information for the future conservation of the diverse ocean ecosystems as well as sustainable use of marine resources.

Recent studies have revealed that the taurine transporter (TAUT) plays important roles in environmental adaptations of marine mollusks (Toyohara et al. 2005; Inoue et al. 2008). TAUT belongs to GABA transporter (GAT) group, one of the main groups in a gene family of transmembrane proteins called the solute carrier 6 (SLC6) family (Kristensen et al. 2011). The GAT group has been well studied in mammals; there are 6 members including TAUT, four GABA transporters (GAT-1, -2, -3, -4) and a creatine transporter (CT-1), each of which has important roles in maintaining physiological homeostasis, in mammals (Snow and Murphy. 2001; Coni et al. 2004; Kristensen et al. 2011). On the other hand, the existence and functions of the GAT group have not been well understood in other organisms. Although TAUT has been identified in marine invertebrates and GAT-1 in several insects (Mbungu et al. 1995), coexistence of them has not been demonstrated in a single species yet. Because of a lack of information on GAT group in other organisms, it is unknown how the GAT group members have been arisen and how their substrate preference has been changed during the evolution of species. In this study, I tried to understand evolutionary history of this group through search for genes of GAT group transporter in marine invertebrates followed by phylogenetic and synteny analyses of the GAT group transporters of vertebrates and invertebrates.

2. Methods

Using degenerate primers designed based on the most highly conserved regions in known GAT-1 DNA sequences of several organisms, GAT-1cDNA was cloned by PCR methods from two organisms whose TAUT gene already have been cloned; the deep-sea mussel, *Bathymodioulus septemdierum*, and the krill, *Euphausia superba*. Then, the 5'- and 3'-ends were cloned by RACE-PCR. Phylogenetic tree was constructed by maximum likelihood (ML) methods using amino acid sequences encoded by the GAT-1cDNA from the organisms and amino acid sequences of GAT members in various organisms obtained from various databases. Chromosome localization of genes of members as well as genes located around them was also analyzed in several vertebrates. Finally, the evolutionary history of the GAT group was discussed based on the analysis data.

3. Results

cDNA encoding GAT-1 exhibiting high degrees of sequence homology to insects and human GAT-1 was cloned from *B. septemdierum* and *E. superba*. The encoded peptides were also confirmed to be GAT-1 by phylogenetic analysis. Because GAT-1 and TAUT were demonstrated to coexist in the same Protostomia species, it was verified that they were formed before the divergence of Deuterostomia and

Protostomia. However, phylogenetic analysis showed TAUT of Protostomia species is CT1 although it is functionally similar to TAUT of Deuterostomia species. This implies that the ancestor of Deuterostomia and Protostomia had possessed GAT-1 and CT1 (=common ancestor of members other than GAT-1). Although GATs-2-4 are considered functionally similar to GAT-1, they formed a subclade with mammalian TAUT. Therefore, the classification, GAT, CT, or TAUT, based on their function does not reflect their polygenetic relationship.

Genes of the GAT group members were separately localized in three different regions on chromosomes. The GAT-1, GAT-3, and TAUT genes were closely localized in a region, and the GAT-2 and GAT-4 genes were located next to each other in another region. The CT1 gene was solely localized in the third region. Different sets of other paralogous genes were found near the genes of GAT members in the three regions.

4. Discussion

From the results obtained in this study, the GAT members were possibly formed through following process (Fig.1). Tandem duplication of a common ancestor A gene had created a GAT-1 and the common ancestral gene of others (B) before the divergence of Deuterostomia and Protostomia (Fig.1-①).

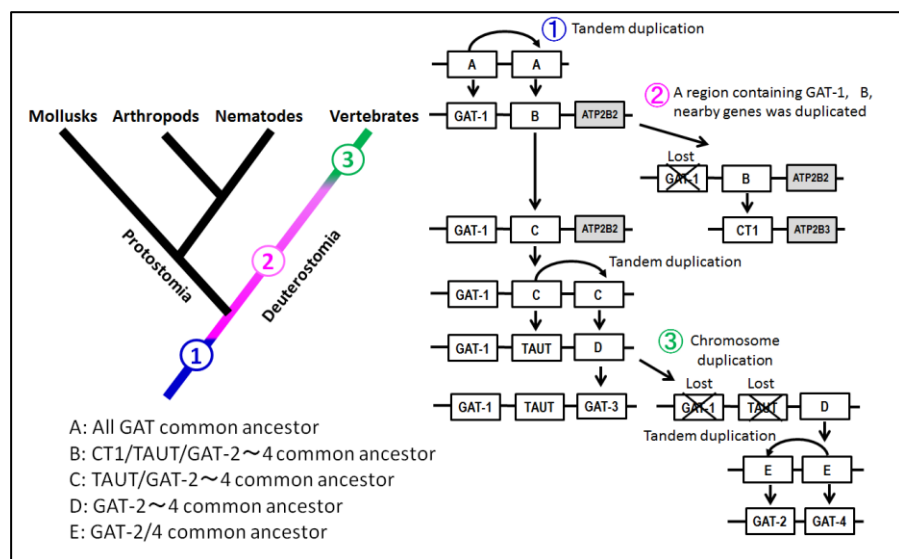


Figure 1. Evolutionary history of the GAT group suggested in this study.

The region containing the GAT-1 and B genes was duplicated (Fig1-②), then CT1 and the common ancestor of TAUT/GAT2~4 (C) was formed from B. Because TAUT has not been identified in Protostomia, it is not sure whether it occurred before the divergence of Deuterostomia and Protostomia and TAUT was lost only in Protostomia or it occurred only in Deuterostomia. Subsequently, C was tandemly duplicated, and the duplicates became TAUT and the common ancestor of GAT-2~4 (D). The region including TAUT and D genes was duplicated by 1st or 2nd whole genome duplication that occurred in vertebrates (Fig1-③), and the copy of D became the ancestor of GAT-2/4 (E), and the original D became GAT-3. E was tandem-duplicated and the duplicates became the GAT-2 and GAT-4 genes.

This study shows that GAT-1 and CT1 (functionally intermediate between CT1 and TAUT) exist in marine invertebrates such as mollusks and arthropods. I expect that, if functional differences between these transporters in marine invertebrates are clarified, not only the history of their functional speciation but also their roles in adaptations of marine invertebrates to environments during the evolution will be revealed.

5. References

- Conti et al. (2004). Brain Research/Brain Research Review, 45: 196-212. Inoue et al. (2008). FEBS Letters, 582: 1542-1546. Kristensen et al. (2011). Pharmacol. Rev., 63: 585-640. Mbungu et al. (1995). Biochem. Biophys., 318: 489-497. Snow and Murphy. (2001). Mol. Cell. Biochem., 224: 169-181. Toyohara et al. (2005). Fish. Sci., 71: 356-360.