

東京大学大学院新領域創成科学研究科

環境学研究系自然環境学専攻

海洋生命環境学分野

平成 23 年度

修士論文

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

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

2012 年 2 月提出

2011 年度 3 月修了

指導教員 井上 広滋 准教授

学籍番号 47-106608 金城 梓

平成  
23  
年度修士論文

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

金城  
梓

# 目次

第1章 序論-----	1
第2章 シチヨウシンカイヒバリガイとナンキョクオキアミからのGAT-1cDNAの単離----	3
2-1. 背景と目的	
2-2. 試料と方法	
2-3. 結果	
2-4. 考察	
第3章 GATグループの分子系統解析-----	15
3-1. 背景と目的	
3-2. 試料と方法	
3-3. 結果	
3-4. 考察	
第4章 GATグループ遺伝子の形成過程-----	20
4-1. 背景と目的	
4-2. 方法	
4-3. 結果	
4-4. 考察	
第5章 総合考察-----	24
5-1. GATグループの分子進化の過程	
5-2. 今後の展望	
謝辞-----	28
引用文献-----	29
Appendix-----	34

## 第1章 序論

海産無脊椎動物は浅海から深海まで多様な海洋環境に分布し、種ごとに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が、海洋の生態系とその多様性、さらにそれぞれを取り巻く環境を保全するための基礎的な知見として役立つと考えられる。また、生物が独自に発達させてきた環境適応機能を理解することにより、新たな遺伝子資源を発見できる可能性があるうえ、水産業においては、環境適応性に優れた形質を持つ種苗を安定的に生産する技術の開発に貢献できると考えられる。

近年の研究により、代表的な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 (Hosoi et al. 2005, 2007, Inoue et al. 2008)。TAUT の機能は脊椎動物で研究が進んでおり、タウリンやヒポタウリンなどの遊離アミノ酸を細胞内へ輸送してオスモライトとして用いることにより、細胞の浸透圧調節を行うことが知られている (Uchida et al. 1992, Takeuchi et al. 2000, Takeuchi et al. 2001)。軟体動物においても TAUT は同様な働きを持ち、マガキやムラサキイガイにおいては塩分濃度の変化の激しい環境への適応に寄与していることが示唆されている (Toyohara et al. 2005, Hosoi et al. 2005, 2007)。さらに、TAUT は深海の熱水噴出域や冷湧水域に棲息する二枚貝類にも存在することがわかっている (Inoue et al. 2008, Koito et al. 2010a,b)。これら二枚貝類に存在する TAUT は、環境中に存在する有害な硫化物に結合して無毒化するヒポタウリンを細胞内に取り込む役割を担っていることが示唆されている (Pruski and Fiala-Medioni. 2003, Yancey. 2005)。

TAUT は、膜輸送体蛋白質ファミリーの一種である SLC6 (Solute Carrier 6) ファミリーに属する輸送体である (Höglund et al. 2005, Kristensen et al. 2011)。SLC6 ファミリーの輸送体は、ヒトにおいて 20 種類存在していることがわかっており、輸送する基質によって、アミノ酸輸送体グループ I、アミノ酸輸送体グループ II (Orphan 輸送体)、モノアミン輸送体グループ II、GABA 輸送体グループと呼ばれる 4 つのグループに分けられる (Bröer 2006)。TAUT は、GABA 輸送体グループ (GAT グループ) に属する。GAT グループには、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) が存在することがヒトを含む哺乳類において確認されている (Kristensen et al. 2011)。なお、GAT-4 は BGT-1 (Betain/GABA transporter1) とも呼ばれている。GAT-1~4 の輸送体は、主として抑制性の神経伝達物質として働く  $\gamma$ -アミノ酪酸 (GABA) を、CT1 はエネルギー代謝に関わるクレアチンをそれぞれ細胞内へ取り込み、それぞれの基質の量を制御して生体内の生理的恒常性維持を司っている (Snow and Murphy 2001, Coni et al. 2004)。以上のように、GAT グループは、哺乳類の体内の恒常性維持のために重要な役割を果たす輸送体グループである。

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、数種の昆虫や *Caenorhabditis. elegans* において GAT-1 の存在が報告されているのみである。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、まず海産無脊椎動物の GAT グループの機能やその進化の過程を調べる手がかりとして、TAUT 遺伝子の存在が確認されているシチヨウシンカイヒバリガイとナンキョクオキアミから GAT-1 遺伝子 (cDNA) の単離を試みた。次に、単離された cDNA の配列情報を用いて、DNA データベースの探索を行い、得られた配列の分子系統解析を行った。さらに、ゲノムデータベースが存在する動物種間で比較ゲノム解析を行った。以上の結果をともに、GAT グループの進化過程の考察を試みた。

## 第2章 シチヨウシンカイヒバリガイとナンキョクオキアミからの GAT-1cDNA の単離

### 2-1. 背景と目的

これまで無脊椎動物では、GAT グループの輸送体として TAUT と GAT-1 の 2 種類の輸送体の存在が報告されている。TAUT は前述の通り海産の軟体動物で報告されており、一方、GAT-1 は、キイロショウジョウバエ、タバコスズメガ、イラクサギンウワバなどの数種の昆虫や *C. elegans* で報告されている (Mbungu et al. 1995, Neckmeyer and Cooper 1998, Gao et al. 1999, Jiang et al. 2005)。これらはすべて前口動物である。後口動物である哺乳類も GAT-1 と TAUT を持っていることから、前口動物と後口動物が分岐する前の共通祖先で少なくともこれら 2 つの輸送体が遺伝子重複により形成されたことが示唆される。しかし、全ゲノム配列がわかっているキイロショウジョウバエからは TAUT の遺伝子はみつかっておらず (Thimagan et al. 2006)、軟体動物からは GAT-1 は見つかっていない。すなわち、前口動物の系統においてこれまで同じ生物種から両方の輸送体がみつかった例がないため、実際にこれらの輸送体が 2 種の輸送体に分岐していることは直接証明されていない。そのため、前口動物には TAUT と GAT-1 の共通祖先であるひとつの輸送体しか存在せず、昆虫や軟体動物でそれぞれ別の名がつけられている可能性も考えられる。そこで、本章では、既に TAUT の遺伝子が単離されている海産無脊椎動物種から GAT-1 遺伝子の単離を行い、両方の輸送体が同種に存在することを確認することにより、これらの輸送体が形成されたのが前口動物と後口動物の分岐以前であったことを証明することを目的とした。

### 2-2. 試料と方法

#### 2-2-1. 生物試料

既に TAUT の遺伝子が単離されている軟体動物のシチヨウシンカイヒバリガイ (*Bathymodioulus septemdierum*) (Inoue et al. 2008) と節足動物のナンキョクオキアミ (*Euphausia superba*) (未発表) を用いた。シチヨウシンカイヒバリガイ (図 2-2) は伊豆・小笠原諸島海域の明神海丘、水曜海山、木曜海山の水深 1200–1400m の熱水噴出域に棲息するイガイ科の二枚貝である (藤倉ほか、2008)。本研究では、『なつしま』研究航海 NT05-06 において、独立行政法人海洋研究開発機構 (JAMSTEC) の無人潜水艇「ハイパードルフィン」により、伊豆小笠原海域の水深約 1300m にある明神海丘 (32°06'N 139°53'E) の熱水噴出域から採集された試料を用いた (図 2-1)。試料は、採取後、船上ですぐに解剖ののち、-80°C で冷凍保存されていた。ナンキョクオキアミは、オーストラリア南極局 (Australian Antarctic Division, Kingston, Tasmania) で飼育されている個体を、Dr. So Kawaguchi に提供して頂いた。



図 2-1. 本研究で用いた生物試料の採集地である伊豆小笠原海域・明神海丘の位置

地図は UNAVCO Map Too ([http://jules.unavco.org/Voyager/Earth?n=32.100&e=139.850&dn=4.5&de=6&gmt=2&geo=4&opt=256&lbl=64&pre=si\\_gvp](http://jules.unavco.org/Voyager/Earth?n=32.100&e=139.850&dn=4.5&de=6&gmt=2&geo=4&opt=256&lbl=64&pre=si_gvp)) から取得



図 2-2. 試料として用いたシチヨウシンカイヒバリガイ (*Bathymodioulus septemdierum*)

### 2-2-2. RNA 抽出と cDNA の合成

冷凍保存されていたシチヨウシンカイヒバリガイの鰓とナンキョクオキアミの眼（柄を含む）から、ISOGEN (Nippon Gene, Toyama, Japan)を用いて、全RNAを抽出した。その後、それぞれ2  $\mu$  gの全RNAから、SMART cDNA Library Construction Kit (Clontech, Palo Alto, CA)に付属するSMART-Scribe Reverse Transcriptaseを用いて逆転写反応を行い、一本鎖cDNAを合成した。そして、合成した一本鎖cDNAを鋳型として、キット添付のプロトコールに従ってLD-PCR法により二本鎖のcDNAを増幅し、これをPCR反応の際のテンプレートcDNAとした。

### 2-2-3. プライマーの設計

GAT-1の部分配列の単離のために、4種類の無脊椎動物（キイロショウジョウバエ、タバコスズメガ、セイヨウミツバチ、*C. elegans*）と4種類の脊椎動物（ヒト、ウシ、マウス、アフリカツメガエル）のGAT-1をアライメントして、塩基配列の保存性の高い領域から、それぞれ3種類のフォワードおよびリバースのdegenerateプライマーを作成した。

### 2-2-4. シチヨウシンカイヒバリガイのGAT-1cDNAの増幅

以下に記述するすべてのPCRには、とくに記述がない限り、ExTaq (Takara Bio, Otsu, 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整した。はじめに、シチヨウシンカイヒバリガイの鰓から得られた二本鎖cDNAを鋳型として、設計したdegenerateプライマーのうちGAT-1-F-3 (TGGACNGGNAARGTNGTNTA) とGAT-1-R-2 (CCYTCNAYNGTRCARAAYTG) を用いて、Touchdown-PCR法 (TD-PCR) により、シチヨウシンカイヒバリガイのGAT-1の部分配列の増幅を行った。反応条件は、最初に98°Cで1分変性させた後、10秒の熱変性 (98°C) ・30秒のアニーリング (56.5°Cから46.5°Cまで1サイクル毎に0.5°Cずつ温度を下げた) ・60秒の伸張反応 (72°C) のセットを20サイクル、続いて同セットのアニーリングの温度条件を46.5°Cに固定して、25サイクルのPCR反応を行った。最後の伸張は72°Cで7分間行った。そして、得られたPCR産物は、2-2-6に記載の手順でサブクローニングを行い、配列決定した。

得られた配列の上流および下流の配列は、5'-および3'-RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) によりそれぞれ単離した。5'-RACEにおいては、特異的な増幅産物を増やすために、まず、特異的リバープライマーBs-GSP-R3 (CAAACCCAGCAAAGATACTGGTACAAC)のみを含み、アダプタープライマーを含まない反応液でPCRを行った。PCRの条件は、最初に98°Cで1分変性させた後、98°Cで10秒の熱変性・60°Cで30秒のアニーリング・72°Cで2分30秒の伸張反応を35サイクル繰り返し、最後の伸張を72°C、7分で行った。そして、その増幅産物を鋳型にして、合成された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 (Library Construction Kitに付属) を改変して設計された5'-PCR-inner とBs-GSP-R1 (TTCCTTCAGCTGCTCCAGGTAATGTAAC)を用いてTD-PCRを行った。TD-PCR



は、最初に 98℃で 1 分変性させた後、98℃で 10 秒の熱変性・72.2℃で 30 秒のアニーリング・72℃で 60 秒の伸張反応のセットを 20 サイクル繰り返し、続いて同セットのアニーリングの温度条件を 69.2℃に固定して 25 サイクル、最後に 72℃で 7 分の伸張反応を行った。その後、同様にサブクローニングと配列決定を行った。

下流配列は、degenerate プライマーによる PCR で得られた部分配列から設計した特異的なフォワードプライマーと、合成された cDNA の 3'末端に付加された配列に特異的な CDSIII プライマー (Library Construction キットに付属) を改変して設計された CDSIII-adapt (ATTCTAGAGGCCGAGGCGGCCGACAT) リバースプライマーの組み合わせを用いて、RACE により増幅した。その際、5'-RACE と同様に、はじめに特異的なフォワードプライマー Bs-GSP-F1 (TTCACAGGTTTGGATTGATGCTGCAACT) のみを含み、CDSIII-adapt を含まない反応液を調整して、PCR を行った。反応条件は、98℃で 1 分変性させた後、98℃で 10 秒の熱変性・65℃で 30 秒のアニーリング・72℃で 2 分 30 秒の伸張反応を 35 サイクル繰り返し、最後の伸張を 72℃で 7 分間行った。その後、その PCR 産物を鋳型にして CDSIII-adapt と Bs-GSP-F2 (TTATGGCCCATGAACAAAACCAACCTG) を用いて TD-PCR を行った。反応条件は、最初に 98℃で 1 分変性させた後、10 秒の熱変性 (98℃)・30 秒のアニーリング (77℃から 71℃まで 1 サイクル毎に 0.3℃ずつ温度を下げた)・2 分 30 秒の伸張反応 (72℃) を 20 サイクル、続けて、アニーリングの温度条件のみを 71℃に固定して 25 サイクルの PCR 反応を行った。最後の伸張は 72℃で 7 分間行った。得られた増幅産物は同様にサブクローニングと配列決定を行った。

上流と下流の配列を決定後、それぞれの末端に特異的なプライマーを設計し、TD-PCR により全長配列の増幅を行った。TD-PCR には、BS-GSP-F6

(ATGCAGATAGAGAAATATGAACTCGAAC) と Bs-GSP-R5

(GGCTTTTTTAATTACCTCATACAGAAGATA) プライマーの組み合わせを用いた。この反応においては、配列を正確に増幅するために、正確性の高い KOD-plus-NEO (TOYOBO, Tokyo, Japan) を使用した。さらに、できるだけ PCR の過程を減らして PCR によるエラーを最小限に抑えるために、鋳型には LD-PCR 法により増幅された二本鎖 cDNA ではなく、一本鎖 cDNA を用いた。この時の TD-PCR の条件は、最初に 98℃で 1 分変性させた後、熱変性を 98℃で 10 秒、アニーリングを 63℃から 1 サイクル毎に 0.4℃ずつ温度を下げて、最終的に 57℃まで下げて 30 秒、伸張反応を 72℃で 2 分 30 秒として、この一連の反応を 20 サイクル繰り返した後、アニーリングの温度条件を 57℃にして 25 サイクル行い、最後の伸張を 72℃、7 分間行った。その後、同様にサブクローニングと配列決定を行った。

#### 2-2-5. ナンキョクオキアミの GAT-1cDNA の増幅

ナンキョクオキアミからの GAT-1cDNA の単離は、シチヨウシンカイヒバリガイの場合と基本的に同様の方法で行った。Degenerate PCR は、ナンキョクオキアミの眼から得られた二

本鎖 cDNA を鋳型として、GAT-1-F-2 (AARAAAYGGNGGNGGNGCNTT) と GAT-1-R-3

(TGGACNGGNAARGTNGTNTA) を用いて TD-PCR を行った。その際、アニーリングの温度は、65℃から 1 サイクル毎に 0.5℃ずつ温度を下げて 25 サイクル行とし、その後の PCR は、アニーリングの温度を 55℃に固定して行った。

5'-および3'-RACEについても、シチヨウシンカイヒバリガイと同様に、特異的プライマーのみを用いる反応により、目的配列をあらかじめ増やしてから、RACEを行った。5'-RACE は、Es-GSP-R3 (AAAGAGCGCCCAACACAACACAATGAT) を用いてアニーリング温度を 68℃とした。その増幅産物を鋳型にしての、5'-PCR-innerと Es-GSP-R1

(AGGAACATGGGCACCCACAGCATAAC) によるTD-PCRは、アニーリング温度を73℃ 73℃から1サイクル毎に0.3℃ずつ温度を下げ、最終的に67℃まで20サイクルとし、その後の反応は、アニーリングの温度条件を67℃に固定して25サイクルの増幅を行った。

3'-RACE は、Es-GSP-F1 (CAAGGTATGGATGGAGGCTGTCTCACA) を用いてアニーリング温度を 64℃で片側鎖の増幅を行い、次に、その PCR 増幅産物を鋳型にして、Es-GSP-F4 (GGTCTCACCTGTGTTACCAAGGGTGG) と CDSIII-adapt の組み合わせによる TD-PCR を 79℃から 77℃まで 1 サイクル毎に 0.1℃ずつ温度を下げて 30 秒のアニーリングで 20 サイクル行い、その後、アニーリング温度を 77℃に固定して 25 サイクルの増幅を行った。

上流・下流の配列を決定後、それぞれの末端に特異的なプライマーES-GSP-F6

(GCACTTGGAGTGGGAAAGTCAGAGT) と Es-GSP-R8

(GAATGTTACTTTTGATCCTTTTGTGTGTC) を設計し、KOD-plus-NEO (TOYOBO, Tokyo, Japan) を用いて PCR により全長配列の増幅を行った。鋳型としてナンキョクオキアミから得られた一本鎖の cDNA を用いた。PCR 反応は、最初に 98℃で 1 分変性させた後、98℃で 10 秒の熱変性、63℃で 30 秒のアニーリング、72℃で 3 分の伸張反応を 35 サイクル繰り返し、最後の伸張を 72℃、7 分で行った。その後、以下の手順でサブクローニングと配列決定を行った。

#### 2-2-6. サブクローニングとインサートチェック

上記で得られたPCR産物は、1%の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, Madison, WI, U.S.A.)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, Madison, WI, U.S.A.)に組み込んだ。そして、Competent high DH5  $\alpha$  (TOYOBO, Tokyo, Japan) を用いて形質転換を行った後、LB培地上で37℃で一晩培養した。培養後、SP6

(GTAAATCCACTGTGATATC) と T7 (TAATACGACTCACTATAGGG) プライマーを用いて、コロニーダイレクトPCRを行った。T7とSP6のプライマーによるナンキョクオキアミの下流配列の増幅は、非特異的な増幅が起こったので、この配列のインサートチェックには

Es-GSP-F4とCDSIII-adaptを用いた。コロニーダイレクトPCRの条件は、最初に95℃で4分変性させた後、95℃で30秒の熱変性、55℃で30秒のアニーリング、72℃でベクターに挿入された配列の長さにより時間を設定して伸張反応を25サイクル繰り返し、最後の伸張は72℃で7分行った。PCR反応後、得られたPCR産物のうち3  $\mu$  lを1%のアガロースを用いて電気泳動し、増幅とPCR産物のサイズを確認した。その後、ExoSAP-IT Kit (USB Corporation, Cleveland, Ohio, USA) を用いて、シーケンシングを行うコロニーダイレクトPCR産物から余剰のdNTPおよびプライマーを除去した。

#### 2-2-7. プラスミド抽出

シチヨウシンカイヒバリガイとナンキョクオキアミのGAT-1cDNA全長配列の決定には、形質転換体からFastGene Plasmid Mini Kit (Nippon Genetics Co.,Ltd., Tokyo, Japan) を用いて、プラスミドDNAを抽出し、鋳型として用いた。

#### 2-2-8. シーケンシング

Big Dye Terminator 3.1 Cycle Sequencing Kit (A-Q)を用いて インサートチェックにより得られたコロニーダイレクトPCRの精製増幅産物およびプラスミドDNAに対してサイクルシーケンス反応を行った。0.8  $\mu$  lのPCRの精製増幅産物またはプラスミドDNAに、1×BigDye Sequencing Buffer 0.5  $\mu$  l、SDW 3.45  $\mu$  l、プライマー0.35  $\mu$  lを加え、最初に96℃で1分変性させた後、96℃で10秒、50℃で5秒、60℃で4分のサイクルを25回繰り返し、最後に60℃で7分のサイクルを1回行った。その後、精製を行い、ABI PRISM 3130X1 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) により塩基配列を決定した。得られた塩基配列は、ATSEQ Ver.9とGenetyx Ver.9 (Genetyx Corporation, Tokyo, Japan) を用いて解析を行った。

#### 2-2-9. 相同性検索とアミノ酸配列の構造推定

シチヨウシンカイヒバリガイとナンキョクオキアミの全長配列を決定後、得られた配列をGenetyx Ver.9によりアミノ酸に翻訳した。そして、それぞれのオープンリーディングフレーム (ORF) のアミノ酸配列を用いてDDBJ (DNA Databank of Japan) が提供しているBLASTプログラム (<http://blast.ddbj.nig.ac.jp/top-j.html>) 内のtblastnにおいて相同性検索を行った。膜貫通部位の推定は、SOSUIプログラム (Hirokawa et al. 1998, [http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/sosui\\_submit.html](http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/sosui_submit.html)) を用いた。

### 2-3. 結果

#### 2-3-1. cDNA クローニング、相同性解析、アミノ酸配列の構造解析

哺乳類、昆虫および *C. elegans* の GAT-1 の配列間で最も保存性が高い領域をもとに合計 6

種類の degenerate プライマーを設計した。脊椎動物では GAT-1 は神経細胞に存在することがわかっている (Borden 1996, 茂里・島本 2006)。そして GAT-1 が存在する神経細胞は、エイでは網膜に存在することから (Andrea et al 2005)、ナンキョクオキアミの眼の組織から cDNA ライブラリーを作成した。そして、設計したプライマーの中で GAT-1-F-2 および GAT-1-R-3 の組み合わせにより、他の生物の GAT-1 と高い相同性を示す cDNA 断片を増幅することができた。一方、シチヨウシンカイヒバリガイには、眼の組織は存在しない。しかし、センチウの筋肉組織に GAT-1 が存在することから、足の組織に GAT-1 が発現していると考え、足の組織の cDNA ライブラリーを作成した。また、二枚貝は、鰓から GABA を取り込むことがわかっており (Wright and Secomb 1984)、鰓組織 cDNA ライブラリーから GAT-1 の単離も試みた。その結果、GAT-1-F-3 と GAT-1-R-2 組み合わせにより鰓組織から GAT-1 様の配列を得ることができた。

両種の部分配列を決定後、それぞれの部分配列に特異的なプライマーを設計して、上流と下流の配列を 5'-と 3'-RACE により単離を試みたが、特異的なプライマーを使用したにも関わらず得られた PCR 産物は非特異的な増幅産物を含み、バンドが複数確認され、目的の cDNA 断片を確認することができなかった。そこで、目的の cDNA 断片を特異的に増幅させるため、5'-RACE 際は、まず特異的なリバースプライマーを用いて、3'-RACE の際には、特異的なフォワードプライマーを用いて予備 PCR 反応を行った。その後、予備の PCR の産物を鋳型にして、別の特異的なプライマーとアダプタープライマーによる 5'-と 3'-RACE を行ったところ、増幅産物は単一のバンドとして確認でき、5'-と 3'-の末端領域の配列を得ることができた。

シチヨウシンカイヒバリガイとナンキョクオキアミからクローニングした全長 cDNA の塩基配列は、それぞれ 611 残基と 626 残基の Open Reading Frame (ORF) を含んでいた (図 2-3) それぞれの ORF のアミノ酸配列を用いた DDBJ の BLAST 検索では、両種の ORF のアミノ酸配列は、キイロショウジョウバエの GABA 輸送体と予想されているアミノ酸配列 (CG1732) とその他 3 種の昆虫 (イラクサギンウワバ、タバコスズメガ、セイヨウミツバチ) の GABA 輸送体のアミノ酸配列、およびアフリカツメガエルの GAT-1 と最も高い相同性を示した (表 2-1, 2-2)。また、ヒトの GAT グループとの相同性において、両種のアミノ酸配列は GAT-1 との相同性が最も高く、それぞれ 58.2%、52.8%であった (表 2-3)。コードされているタンパク質の膜貫通部位の解析では、12 個の膜貫通部位を持つことが推定され、得られた両者の ORF が 12 回膜貫通型の膜たんぱく質をコードしていることがわかった。また、SOSUI プログラムの膜たんぱく質の 2 次構造予測図によると、両者とも C および N 末端は同じ方向に突き出しており、3 と 4 番目の膜貫通部位の間には長いループが存在することがわかった (図 2-4, 2-5)。

表 2-1. シチヨウシンカイヒバリガイから得られたアミノ酸配列の BLAST 検索の結果

Species	Gene	Identity(%)	Score	E-Value
キイロショウジョウバエ ( <i>Drosophila melanogaster</i> )	CG1732*	60	716	0.0
イラクサギンウワバ ( <i>Trichoplusia ni</i> )	GABA transporter	57	703	0.0
タバコスズメガ ( <i>Manduca sexta</i> )	GABA transporter	56	699	0.0
セイヨウミツバチ ( <i>Apis mellifera</i> )	GABA transporter-1B	56	674	0.0
アフリカツメガエル ( <i>Xenopus tropicalis</i> )	GAT-1	53	665	0.0

\*GABA 輸送体として推定されている輸送体 (Thimagan et al. 2006)

表 2-2. ナンキョクオキアミから得られたアミノ酸配列の BLAST 検索の結果

Species	Gene	Identity (%)	Score	E-Value
イラクサギンウワバ ( <i>Trichoplusia ni</i> )	GABA transporter	56	719	0.0
タバコスズメガ ( <i>Manduca sexta</i> )	GABA transporter	56	716	0.0
キイロショウジョウバエ ( <i>Drosophila melanogaster</i> )	CG1732*	58	709	0.0
セイヨウミツバチ ( <i>Apis mellifera</i> )	GABA transporter-1B	55	657	0.0
アフリカツメガエル ( <i>Xenopus tropicalis</i> )	GAT-1	50	620	e-175

\*GABA 輸送体として推定されている輸送体 (Thimagan et al. 2006)





表 2-3. 2 種の海産無脊椎動物の GAT-1 とヒト GAT グループに属する各輸送体との相同性(%)

Species	GAT-1	GAT-2	GAT-3	GAT-4	TAUT	CT1
シチヨウシンカイヒバリガイ	58.2	53.1	53.2	53.4	53.6	51.6
ナンキョクオキアミ	52.8	52.1	51.2	51.8	50	46.9

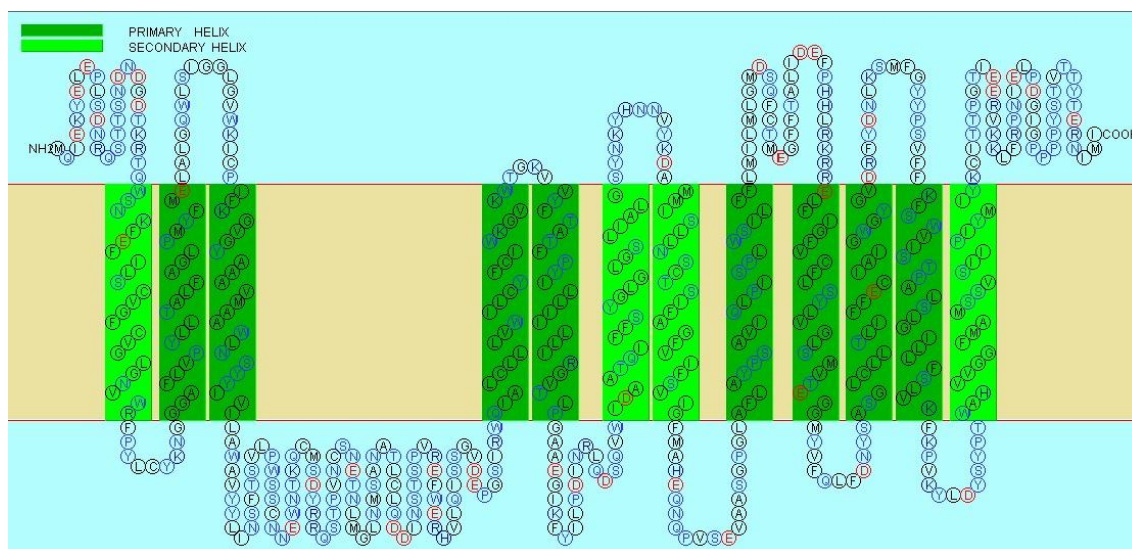


図 2-4. SOSUI プログラムにより予測されたシチヨウシンカイヒバリガイ GAT-1 の 2 次構造予測

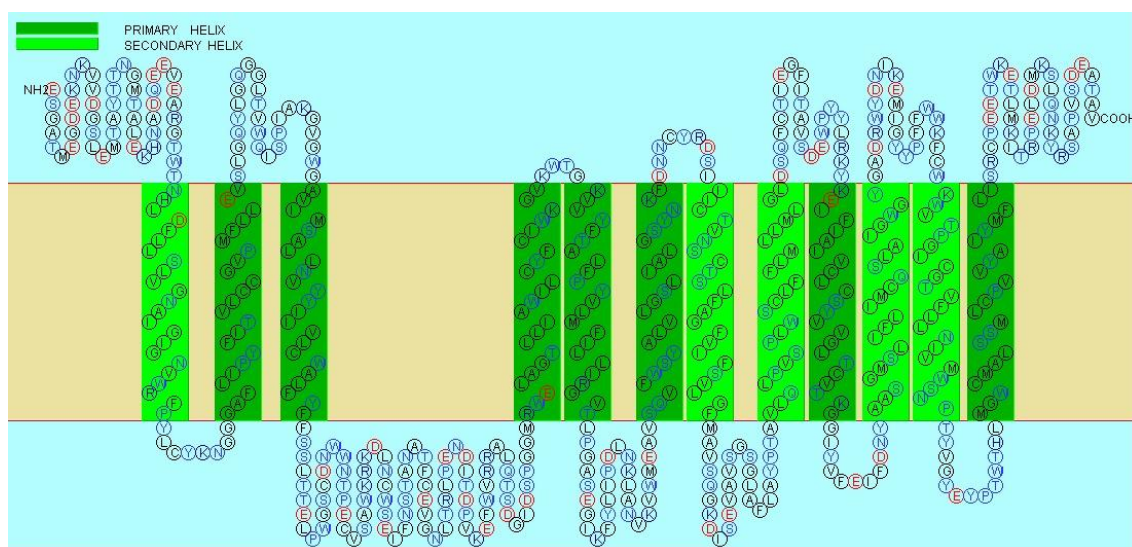


図 2-5. SOSUI プログラムにより予測されたナンキョクオキアミの GAT-1 の 2 次構造予測

## 2-4. 考察

### 2-4-1. cDNA クローニング

GAT グループの各輸送体間の配列は非常に類似しているにも関わらず (Borden et al.1996)、設計した degenerate プライマー (GAT-1-F-3 および GAT-1-R-2、GAT-1-F-2 および GAT-1-R-3) により、両種から GAT-1cDNA の部分配列を特異的に単離することができた。プライマーの設計において、前口動物である昆虫類や *C. elegans* と、後口動物である脊椎動物の GAT-1 の間で保存性が高い領域を用いたため、今回設計に用いたプライマーは、まだ単離されていない様々な生物の GAT-1 の部分配列の単離においても活用できると考えられる。

次に、通常の方法により 5'-と 3'-RACE を行ったが、非特異的な反応物しか得られなかった。その原因は、全ての cDNA の 5'および 3'末端領域に付加されたアダプター配列とアダプタープライマー (5'-PCR-inner および CDSIII-adapt) の親和性が、GAT-1cDNA と特異的プライマーの親和性より高いために、非特異的な増幅が優先的に進んでしまったと考えた。そこで、5'-RACE の際は、まず特異的なリバースプライマーのみを用い、3'-RACE の際には、特異的なフォワードプライマーを用いて予備 PCR 反応を行うことを考えた。これにより、片側の配列のみであるが、目的の配列を特異的に増加させることができると考えた。その後、目的の配列 (片側のみ) が増幅されたそれぞれの PCR 産物を鋳型にして、末端領域に付加されたプライマーと予備反応に用いたプライマーよりも内側に結合する特異的なプライマーを用いてさらに PCR 反応を行えば、目的の cDNA 断片が増幅される確率が増すと考えた。実際にこの方法で 5'-および 3'-RACE を試みたところ、増幅産物は単一のバンドとして確認でき、それぞれの末端の配列を単離することできたため、RACE においてこの方法は有効であると考えられる。

### 2-4-2. 単離した cDNA がコードするアミノ酸配列の構造

上記の手順により単離したシチヨウシンカイヒバリガイとナンキョクオキアミの cDNA がコードするアミノ酸配列は、SLC6 ファミリーに属する輸送体に共通する配列上の特徴を持つことがわかった。SLC6 ファミリーの輸送体は、共通して 12 回の膜貫通部位、3 と 4 番目の膜貫通部位の間に長いループ、細胞外に突き出た N と C 末端を持つことが予測されているが、(Kristensen et al. 2011)、SOSUI プログラムを用いた解析結果では、得られた配列の構造はこれらの特徴と一致した。したがって、両種から得られた配列は SLC6 ファミリーの輸送体であることは確実である。そして、それぞれの ORF のアミノ酸配列は、ヒト、マウス、キイロショウジョウバエ、*C. elegans* などの他の生物の GAT-1 のアミノ酸配列の長さ (599 ~ 636 残基) とほぼ同等であることに加え、BLAST 検索では、同じ前口動物である数種の昆虫や *C. elegans* の GAT-1 と最も高い相同性を示した。また、ヒトの GAT グループの中では、GAT-1 と最も相同性が高いことがわかった。ヒトの GAT-1 の 1 番目の膜貫通部位には、Na<sup>+</sup> の結合部位や GAT-1 の機能に関係するアミノ酸 (Trp68、Arg69、Glu101) が存在する



ことが予測されているが（茂里・島本 2006）、それぞれの配列においてもそれらのアミノ酸残基が存在する相同な領域に同じアミノ酸が存在することが確認された（図 2-5）。

以上により、シチヨウシンカイヒバリガイとナンキョクオキアミから得られた cDNA は、GAT-1cDNA であると考えられ、前口動物にも GAT-1 と TAUT の両方が存在することを証明できた。このことは、両者の分岐が前口動物と後口動物の分岐以前に起こったことを直接的に示している。

## 第3章 GAT グループの分子系統解析

### 3-1. 背景と目的

GAT グループの輸送体は哺乳類を中心とした脊椎動物では研究報告が豊富にあり、これまで、6 種類の輸送体 (GAT-1~4、TAUT、CT1) が同定され、一方、無脊椎動物においては GAT-1 と TAUT の 2 種類のみが同定されている。これらは生物の進化過程で同じ祖先分子から重複により生じ、それぞれ独自の機能を獲得してきたと推察される。しかし、様々な生物において同定された各輸送体の名称は主に機能の類似性から付けられてきたため、各輸送体がどのような系統関係にあり、また、どの輸送体由来であるか明確になっていない。

さらに、近年、脊椎動物において各輸送体の輸送特性の比較や、発現組織の違いについての研究が進み始めているが、依然として種間で輸送体の名称が異なっているなどの混乱が残っているのが現状である (Borden et al. 1996)。それぞれの輸送体の分子系統学的関係を明らかにすることにより、各分子の機能分化を進化の観点から考察することができ、また、各輸送体の名称に関しても正しい指針が得られることが期待される。しかし、これまでに GAT グループの分子系統は脊椎動物以外の情報が不足していることもあって十分に解析されていない。

前章では、これまで GAT グループの情報が少なかった前口動物のシチヨウシンカイヒバリガイとナンキョクオキアミから GAT-1cDNA を単離することに成功した。本章では、得られたシチヨウシンカイヒバリガイとナンキョクオキアミの GAT-1 の配列情報をもとに既存の DNA 配列データベースを検索し、検出された様々な生物の GAT グループのメンバーのアミノ酸配列を用いて分子系統解析を行うことにより、それぞれの輸送体の分子系統学的な位置づけを明らかにした。

### 3-2. 試料と方法

#### 3-2-1. 分子系統解析

第2章で得られたシチヨウシンカイヒバリガイとナンキョクオキアミのGAT-1およびTAUTや、ヒトのGATグループの各輸送体と相同性の高い配列を、Ensembl

(<http://asia.ensembl.org/index.html>) およびNCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 上で BLAST (tblastn) により検索した。得られた各生物種のGATグループの輸送体様のアミノ酸配列、シチヨウシンカイヒバリガイ、ナンキョクオキアミのGAT-1およびTAUT、ヒトのGATグループの各輸送体をMAFFT version 6 (Kato et al. 2009, <http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>) を用いてアライメント、trimAl v1.2 (Capella-Gutiérrez et al. 2009, <http://trimal.cgenomics.org/>) によりアライメントが困難な領域を自動的に削除した。そして、RAxMLプログラム (Stamatakis 2006, Stamatakis et al. 2008) によりブートストラップ解析を1000回行い、最尤法により系統樹を構築した。

### 3-3. 結果

#### 3-3-1. 分子系統解析

データベースの BLAST 検索により、シチヨウシンカイヒバリガイとナンキョクオキアミの TAUT および GAT-1、ヒトの GAT グループと高い相同性を示すアミノ酸配列を後口動物であるウニ、ホヤや原始的な脊椎動物であるヤツメウナギなどから得ることができた。それらの配列と、これまで同定されている、代表的な脊椎動物（ヒト、マウス、ニワトリ、グリーンアノール、アフリカツメガエル、メダカ、イトヨ）の GAT グループ、軟体動物の TAUT や数種の昆虫、*C. elegans*、そして本研究で得られたシチヨウシンカイヒバリガイとナンキョクオキアミの GAT-1 のアミノ酸配列を用いて、分子系統解析を行った。その結果、GAT-1 は独立したクレードを形成し、その中にシチヨウシンカイヒバリガイとナンキョクオキアミの GAT-1 も含まれていた（図 3-1）。一方、GAT-2~4 の輸送体と、CT1 や TAUT は GAT-1 のクレードとは独立のひとつのクレードを形成した。その中で、二枚貝類の TAUT は、哺乳類の TAUT ではなく、脊椎動物の CT1 とサブクレードを形成し、脊椎動物の TAUT は、GAT-2~4 とともに、別のサブクレードを形成した。また、ヤツメウナギ、ウニ、ホヤのゲノムから検出された GAT グループ様の配列には、GAT-1、TAUT、CT1 とクレードを形成するものが存在した。

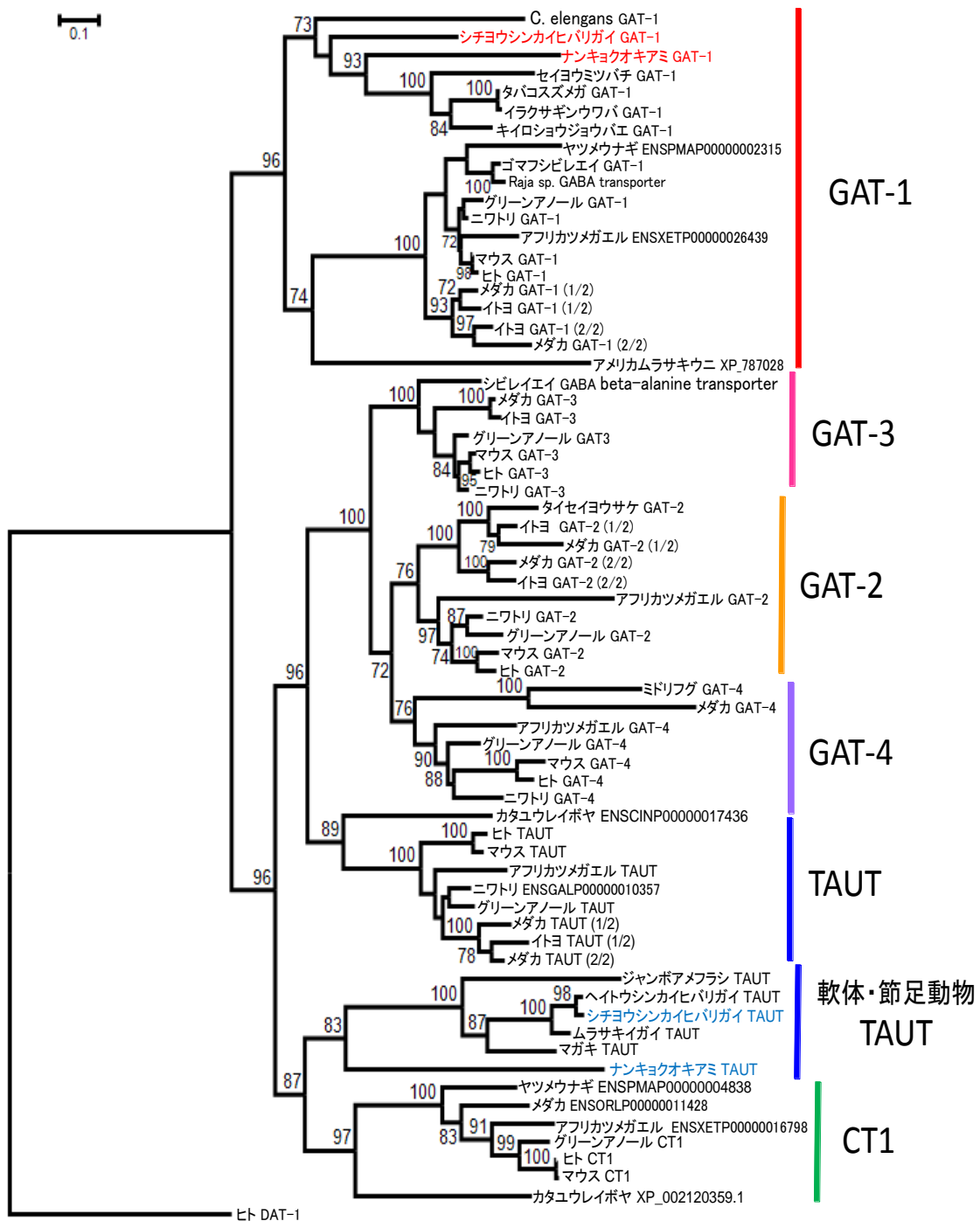


図 3-1. 最尤法による GAT グループの分子系統樹

枝上の数字は信頼度を表すブートストラップ値である。ブートストラップ値が 70%未満は省略した。外群には SLC6 ファミリーのモノアミン輸送体グループに属するヒトのドーパミン輸送体 (DAT-1) を用いた。赤色と青色で色付けした文字はシチヨウシンカイヒバリガイとナンキョクオキアミの GAT-1 と TAUT をそれぞれ表す。

### 3-4. 考察

#### 3-4-1. GAT-1 の位置づけ

得られた系統樹では、シチヨウシンカイヒバリガイとナンキョクオキアミから得られた配列は他の生物の GAT-1 と同じクレード内に位置しているため、両種の GAT-1 は脊椎動物の GAT-1 とオーソログスであることが支持された。GAT-1 クレード内の系統関係は、生物の進化過程を反映するように前口動物と後口動物の GAT-1 クレードに分かれ、シチヨウシンカイヒバリガイとナンキョクオキアミの GAT-1 は前口動物の GAT-1 クレードに属した。前口動物、後口動物それぞれのサブクレード内の系統関係も、一部のブートストラップ値が低いものの、概して生物の進化過程を反映していた (図 3-1)。そして、GAT-1 のクレードは最も basal な位置で分岐していたため、GAT-1 は GAT グループの中でも最も早く分岐したことがわかった。格言すれば、GAT グループの最初の分化は、GAT-1 と、GAT-1 以外のメンバー (TAUT、CT1、GAT-4) の共通祖先との分岐であったと考えられる。

#### 3-4-2. TAUT と CT1 の分子系統学的な関係

分子系統解析の結果 (図 3-1) は、GAT-1 以外の輸送体の共通祖先が、次に CT1 と TAUT/GAT2-4 の共通祖先に分岐したことを示している。ここで、注目すべきは、前口動物の TAUT として報告されてきたシチヨウシンカイヒバリガイとナンキョクオキアミを含む前口動物の TAUT が、脊椎動物の TAUT とでなく CT1 と同じサブクレードを形成したことである。この結果は、前口動物で輸送特性をもとに TAUT として記載されてきた輸送体 (Toyohara et al. 2005, Hosoi et al. 2007 ; Inoue et al. 2008) は、分子系統学的にはむしろ CT1 であることを示唆している。これらの前口動物の輸送体は、脊椎動物の TAUT と類似した基質特異性を持ち、ともに細胞浸透圧調節の機能を担っていることが示されてきたため (Uchida et al. 1992, Takeuchi et al. 2000, Takeuchi et al. 2001, Toyohara et al. 2005, Hosoi et al. 2007)、この結果は予想外であった。実際にこれらの輸送体がクレアチンを輸送するかどうかを検証した例はないが、CT1 の機能に必要なアミノ酸残基が保存されていることより、クレアチンを輸送する可能性は高い。すなわち、前口動物でこれまで TAUT として記載された輸送体は、TAUT の機能を併せ持つと CT1 であることになる。この場合、脊椎動物の TAUT とオーソログスな輸送体の遺伝子も別に存在する可能性がある。そのような遺伝子はこれまで見つかっていないため、進化の過程で失われた可能性もある。脊椎動物の CT1 はタウリンとは親和性が低く (Peral et al. 2002)、一方で TAUT はクレアチンに対して親和性が低いことがわかっている (Tomi et al. 2008)。すなわち、脊椎動物においては、CT1 と TAUT の機能は明確に分化している。前口動物の TAUT が失われ、CT1 だけが残っているとすれば、残っている CT1 が脊椎動物における CT1 と TAUT の両方の機能を担っていると考えられる。

一方、CT1 と TAUT の両方の機能を担っていることは、脊椎動物の CT1 と TAUT の共通

祖先の性質をそのまま保持しているとも考えられる。このことから、前口動物と後口動物の分岐前にはまだ CT1 と TAUT は重複しておらず、TAUT は後口動物の系統で CT1 と同じ祖先分子から重複して形成された可能性も考えられる。この仮説は分子系統樹の形とは矛盾するが、機能的制約により脊椎動物の CT1 の重要な部位のアミノ酸が保存されたため、分子系統樹では祖先分子とサブクレードを形成した可能性も否定できない。このような例は他の遺伝子ファミリーでも報告がある(山口陽子、私信)。いずれにせよ、前口動物の TAUT としてこれまで単離された輸送体は、脊椎動物の TAUT とは単系統にはならないため TAUT と名付けるのは分子進化の観点からは正確ではないと考えられる。なお、ホヤではこれまで GAT グループの輸送体は同定されてなかったが、少なくとも TAUT と CT1 は存在することが明らかとなった(図 3-1)。したがって、尾索動物と脊椎動物の共通祖先では、TAUT と CT1 は独立して存在していたことになる。

### 3-4-3. GAT-2~4 の分子系統学的な位置づけ

GAT-2~4 は、GABA に対して最も親和性を持つにも関わらず、GAT-1 ではなく、TAUT や CT1 (CT1/TAUT も含む) と同じクレードに属した。そして、GAT-2~4 の輸送体は TAUT と最も近縁であった。GAT-2~4 は、ヒポタウリンと親和性を持つことがわかっており、また、GAT-2 および GAT-3 は  $\beta$ -アラニンと高い親和性を持つことがわかっている (Borden 1992, Borden et al. 1995, Borden 1996, Christiansen et al. 2007)。ヒポタウリンと  $\beta$ -アラニンはどちらも TAUT と親和性の高い基質であり、GAT-1 とは親和性が低いことがわかっている (Borden, 1996)。このように、TAUT と近縁であるという結果は、GAT-2~4 の基質特異性からも裏付けられ、これらは TAUT から派生して、機能を分化したと考えられる。以上のことから、GAT-1 とその他の GAT は単系統ではないため、GAT グループというグループ分けも、分子進化の観点からは適切ではないと考えられる。

分子系統樹の形から、GAT2-4 なかで、最初に派生したのは GAT-3 であり、軟骨魚類であるシビレエイから発見されることより、GAT-3 は軟骨魚類と硬骨魚類の分岐以前に生じており、GAT-2 や GAT-4 は GAT-3 のあとで形成されたと考えられる。

## 第4章 GAT グループ遺伝子の形成過程

### 4-1. 背景と目的

分子系統解析により、シチヨウシンカイヒバリガイとナンキョクオキアミから得られた配列が GAT-1 であることが支持され、そして、前口動物の TAUT は系統的には CT1 であることが明らかとなり、これら 2 つの輸送体が現存する脊椎動物の GAT グループの原型であることが示唆された。ヒトの GAT グループにおいて、GAT-1、GAT-3、TAUT は 3 番染色体に GAT-2 と GAT-4 は 12 番染色体にそれぞれタンデムに存在することがわかっている (Maureen et al. 2007)。このことから、生物の進化過程で、GAT グループは遺伝子重複や染色体重複によってその数と機能を増やしてきたことが推定できる。しかし、GAT-1 と同様に GAT グループの中では古い時期に形成され、GAT-2~4 および脊椎動物の TAUT の祖先分子に最も近い輸送体である CT1 は X 染色体に独立して存在しており、どのような道筋で形成されたか明確になっていない。また、TAUT や GAT-2~4 がいつどの系統で生じたか明確になっていない。そこで、GAT グループの遺伝子の分子進化の過程を、遺伝子の位置関係から考察するため、GAT グループのメンバーを最も多種類保有する脊椎動物の染色体マップ上で、輸送体の遺伝子位置関係および周辺の遺伝子を調べるシンテニー解析を行った。

### 4-2. 方法

シチヨウシンカイヒバリガイとナンキョクオキアミの GAT-1 や TAUT、またはヒトの GAT-2~4、CT1、TAUT の配列を用いて、全ゲノムデータを統合して染色体地図を構築している Ensembl データベース上において、ヒトとメダカの全ゲノム配列に対して BLAST 検索を行い、検出された配列のゲノム上における位置関係を調べた。また、トカゲの一種であるグリーンアノールの全ゲノム配列からは、BLAST 検索では各輸送体の区別が困難であったため、データベース上でアノテーションされている名称に従い、各輸送体のゲノム上における位置関係を調べた。さらに、検出された配列の近隣の遺伝子を比較し、それぞれの輸送体が存在する染色体間に共通の遺伝子のパラログが存在するかを調べた。

### 4-3. 結果

#### 4-3-1. GAT グループ遺伝子の位置

脊椎動物では共通して GAT-1、TAUT、GAT-3 の遺伝子が同一染色体に近接して存在していることがわかった。ヒトでは 3 番染色体、メダカでは 5 番染色体 (LG5)、グリーンアノールでは 2 番染色体 (LG2) にこれらの遺伝子は存在していた (図 4-1, 4-2, 4-3)。さらに、メダカでは、5 番染色体以外にも 7 番染色体 (LG7) に GAT-1 と TAUT が近接して存在していた (図 4-3)。GAT-2 と GAT-4 は、ヒトでは 12 番染色体、グリーンアノールでは 5 番染色体 (LG5) にタンデムに存在していた (図 4-1, 4-2)。メダカも、GAT2 と GAT4 は同一染色

体 (LG23) 上に存在していた (図 4-3)。また、6 番染色体 (LG6) から GAT-2 が検出された (図 4-3)。ヒトでは X 染色体に存在する CT1 は、グリーンアノールでは、GAT-1/TAUT/GAT-3 が存在する 2 番染色体 (LG2) 上に存在していた (図 4-2)。メダカの CT1 遺伝子は、データベース上では、検出できなかった。

#### 4-3-2. 近隣の遺伝子の比較

ELKS/RAB6-interacting/CAST (ERC)、transmembrane and coiled-coil domain family (TMCC)、PRICKLE 遺伝子のホモログが、ヒトでは 3 番と 12 番染色体にそれぞれ存在した (3 番染色体に ERC2、TMCC1、PRICKLE2、12 番染色体に ERC1、TMCC3、PRICKLE1 が存在) (図 4-1)。また、メダカでは、それぞれのホモログが 2 つずつ検出され、ERC2、TMCC1、PRICKLE2 が 5 番および 7 番染色体の両方に存在し、一方、ERC1、TMCC3、PRICKLE1 が 6 番および 23 番染色体に存在していた (図 4-3)。さらに、どの種においても、CT1 遺伝子と GAT-1/TAUT/GAT-3 遺伝子の近隣には ATPase, Ca<sup>++</sup> transporting, plasma membrane (ATP2B) の遺伝子のホモログが保存されていた (図 4-1, 4-2, 4-3)。

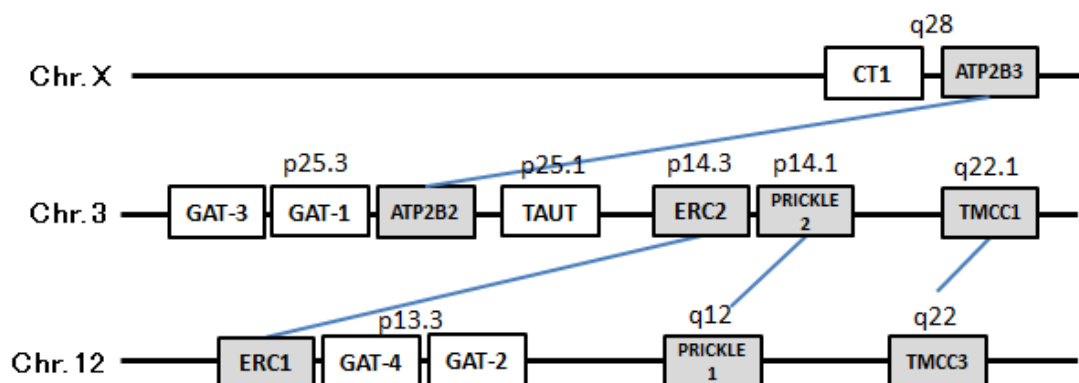


図 4-1. ヒトの GAT グループと近隣の遺伝子の染色体上の位置

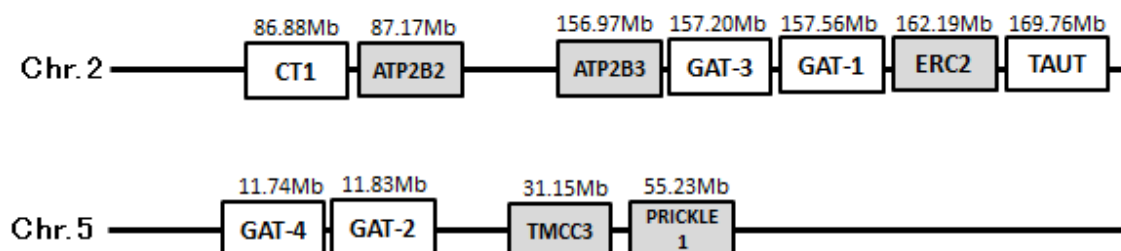


図 4-2. グリーンアノールの GAT グループと近隣の遺伝子の染色体上の位置



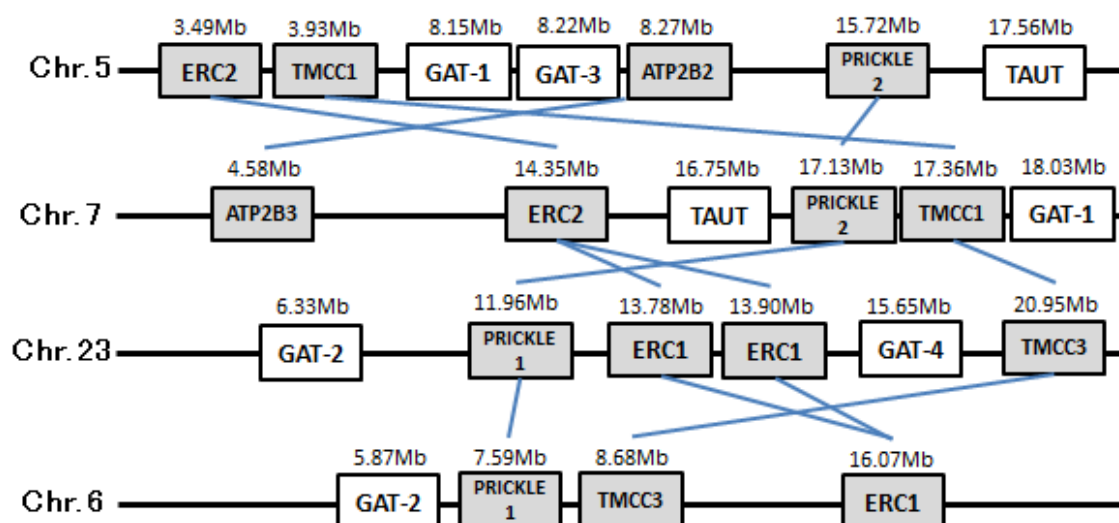


図 4-3. メダカの GAT グループと近隣の遺伝子の染色体上の位置

#### 4-4. 考察

##### 4-4-1. GAT グループの遺伝子の染色体上の位置と形成過程

脊椎動物の染色体において、同一染色体上に GAT-1、GAT-3、TAUT は近接して存在することから、これらの遺伝子は縦列重複により生じたと考えられる。CT1 はヒトでは、GAT-1/GAT-3/TAUT が存在する染色体とは別の染色体に存在し、爬虫類ではこれらの遺伝子と同じ染色体上の離れた位置に存在していた。そして、GAT-1/GAT-3/TAUT の近隣と CT1 の周辺には、ATP2B 遺伝子のホモログが存在している。したがって、CT1 の祖先分子の遺伝子は、GAT-1/GAT-3/TAUT と ATP2B 遺伝子が存在する領域が重複することによって生じ、そして重複した片方の領域は離れた位置に移動したと考えられる。ただし、分子系統解析の結果によると（図 3-1）、TAUT の後に GAT-3 が派生したことが示唆されたことから、この重複の時点では、GAT-3 の遺伝子はまだ存在していなかったと考えられる。

GAT-2/GAT-4 と GAT-1/GAT-3/TAUT の近隣には ERC/TMCC/PRICKLE などの遺伝子のホモログが共通して存在することから、GAT-2/GAT-4 は GAT-1/GAT-3/TAUT の遺伝子が乗る染色体が重複して、GAT-2/GAT-4 が生じた可能性が考えられる。脊椎動物の祖先では染色体全体が 2 回倍加したことが様々な生物の比較ゲノム解析により明らかにされていることから

(Postlethwait et al. 1998)、どちらかの重複の際にこれらの遺伝子は生じた可能性も考えられる。また、真骨魚類では、染色体の倍加がさらに 1 回起こったと考えられている（佐藤・西田、2009）。メダカでは、GAT-1 と TAUT が 5 および 7 番染色体に存在しているが、この 2 つの染色体は同じ祖先型の染色体の倍加により生じたことが示唆されている（Naruse et al. 2004）。このことから、メダカに GAT-1 と TAUT が 2 つずつ存在するのは、真骨魚類で起こった 3 回目

の染色体重複時にGAT-1とTAUTが乗る染色体が倍加されたからだと考えられる。そして、その倍加の後にGAT-3だけが片方の染色体から消失したため、GAT-3は1つしか存在しないと考えられる。また、GAT-3同様にGAT-2/GAT-4遺伝子も23番染色体に1つずつしか存在しないが、これらの遺伝子の近隣に存在するERC、TMCC、PRICKLEの遺伝子が6番染色体に存在することから、GAT-2/GAT-4が乗る染色体も3回目のゲノム重複時に倍加していたと考えられる。メダカの比較ゲノム解析では6番染色体は23番と同じ祖先型の染色体の倍加により生じたことは示唆されていないが、メダカの6番染色体は、真骨魚類の全ゲノム重複後に異なる染色体が融合してできたと示唆されている(Ogoshi et al. 2006, 御輿、2009)。このことから、GAT-2/GAT-4が乗る染色体が倍加した後に、GAT-2/GAT-4は片方の染色体から消失したが、周辺の遺伝子は保存されて、その後の染色体融合によりこれらの遺伝子は6番染色体に存在するようになったと考えられる。

## 第5章 総合考察

### 5-1. GAT グループの分子進化の過程

本研究で得られた結果を総合して、GAT グループの分子進化の過程を考察してみたい。まず、はじめに存在していた共通祖先遺伝子 (図 5-1; A) から、前口動物と後口動物の共通祖先において起こった縦列重複により GAT-1 と、CT1/TAUT/GAT2~4 共通祖先の遺伝子 (図 5-1; B) が形成されたと考えられる。このことを裏付ける証拠は、ゲノム配列が解読されている生物の多くで GAT-1 遺伝子と TAUT 遺伝子が近隣に存在することと、前口動物と後口動物の両方に GAT-1 と TAUT が存在することである。

次に、GAT-1 とタンデムに存在していた CT1/TAUT/GAT2~4 共通祖先遺伝子 (図 5-1; B) が近隣の遺伝子とともに重複して、一方が CT1 遺伝子、一方が TAUT/GAT2~4 共通祖先遺伝子に分かれ、そして、TAUT/GAT2~4 共通祖先遺伝子から TAUT 遺伝子が形成されたと考えられる。分子系統樹によると (図 3-1)、この重複が起こったのは前口動物と後口動物の分岐前であり、分岐後に前口動物の系統で TAUT 遺伝子が消失した可能性も考えられる。この場合、前口動物の CT1 は、失われた TAUT の機能を補うために、祖先分子と同様、CT1 と TAUT の中間的な性質を保持していると推測される。もしくは、第 3 章で述べたように、CT1 と TAUT 遺伝子の分化は後口動物の系統で起こっており、前口動物の CT1・TAUT 様の輸送体は、機能上の制約により構造が CT1 に類似しているものの、CT1 および TAUT の共通祖先に由来しているため、CT1 と TAUT の中間的な性質を示している可能性も考えられる。しかしながら、現段階ではどちらの時期に重複がおこったのかは確定できない。

分子系統解析の結果から、TAUT 遺伝子の次に生じたのは GAT-3 遺伝子だと考えられる。GAT-3 は、TAUT 遺伝子は近接して染色体上に存在することから、TAUT/GAT2~4 共通祖先遺伝子 (図 5-1; C) が縦列重複して、TAUT 遺伝子と GAT2~4 共通祖先遺伝子 (図 5-1; D) が形成され、その後、後者が GAT-2/4 の重複の鋳型となったのち、GAT-3 遺伝子として確定したと考えられる。GAT-3 (または GAT2~4 共通祖先遺伝子) は軟骨魚類において報告例があることから、少なくとも軟骨魚類と硬骨魚類の分岐以前には生じていたと考えられる。加えて、下記のように、GAT-2/4 が脊椎動物の祖先で起こった全ゲノム重複の際に生じたとすれば、GAT-3 の形成はさらに遡って、全ゲノム重複以前に起こったことになる。

分子系統解析によると、GAT-2 と GAT-4 は GAT-3 と近縁であった。そして、GAT-2 および GAT-4 遺伝子が乗る染色体と GAT-3 遺伝子が乗る染色体には共通のパラログ遺伝子が存在することからこれらは、脊椎動物の祖先で 2 回起こった全ゲノム重複のどちらかの際に形成されたと考えられる。したがって、全ゲノム重複時に GAT2~4 共通祖先遺伝子 (図 5-1 D) から GAT2/4 共通祖先遺伝子 (図 5-1 E) が染色体重複体より形成された後、その遺伝子からどちらか 1 つの遺伝子が形成され、その後に縦列重複によりもう 1 つが形成されたと考えられる。そして、GAT-1 と TAUT も GAT-3 とともに倍加したものの、片方の染色体か

ら消失したと考えられる。

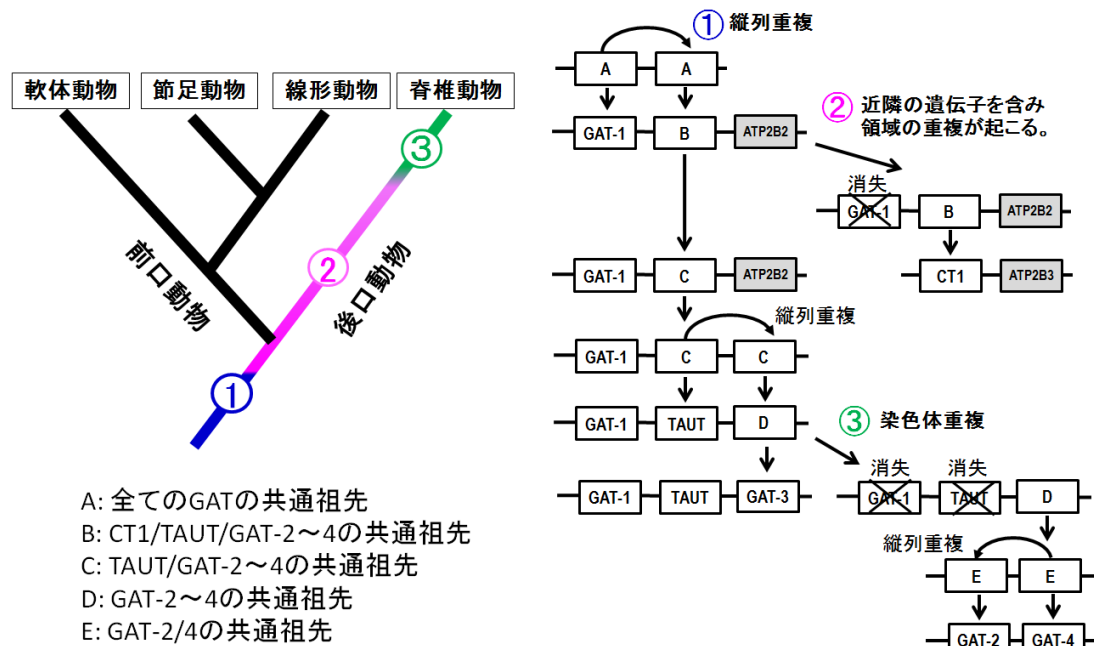


図 5-1. 推測された GAT グループの分子進化の過程

青の線は①が、ピンクの線は②が、緑の線は③が起こったと推定される範囲を表す。

## 5-2. 今後の展望

### 5-2-1. 軟体動物 TAUT のクレアチンの輸送特性解析

分子系統樹では、軟体動物の TAUT は CT1 と近縁であることがわかったが、実際にクレアチンを輸送するか機能を解析する必要がある。脊椎動物の CT1、TAUT、軟体動物の TAUT のアミノ酸配列をアライメントしてみると、CT1 の機能において重要だと考えられているアミノ酸残基 (Phe<sup>68</sup>) (Joanna and Christie, 2007) が、脊椎動物の TAUT にはみられないが、軟体動物の TAUT には存在することがわかった (図 5-2)。したがって、軟体動物の TAUT も CT1 と同様にクレアチンを輸送する可能性が考えられる。

```

ヒト TAUT 50: FVLSVAGGFVGLGNVWRFPY
アフリカツメガエル TAUT 50: FVLSVAGGFVGLGNVWRFPY
ヒト CT1 61: FIMSCVGFVAVGLGNVWRFPY
アフリカツメガエル CT1 47: FIMSCVGFVAVGLGNVWRFPY
シチヨウシンカイヒバリガイ TAUT 57: FLLACVGFVGLGNVWRFPF
ヘイトウシンカイヒバリガイ TAUT 57: FLLACVGFVGLGNVWRFPF
ムラサキイガイ TAUT 56: FLLACVGFVGLGNVWRFPF
マガキ TAUT 53: FLLACIGFVGLGNVWRFPF
ナンキョクオキアミ TAUT 46: FVLSVIGFCVGLGNVWRFPY

```

図 5-2. 軟体動物 TAUT、脊椎動物の CT1 と TAUT のアミノ酸配列の比較

青色部分は CT1 の機能において重要なアミノ酸残基を示す。

### 5-2-2. TAUT と GAT-2~4 の分化時期の特定

前口動物における TAUT の存在や一部の脊椎動物以外における GAT-2~4 の存在がわかっていないため、これらの形成時期が明確になっていない。現在、様々な無脊椎動物のゲノム配列は明らかになりつつあるにも関わらず、アノテーションやゲノムマップの作成が十分に進んでいない。したがって、データベースを用いた解析からは早急に TAUT や GAT-2~4 の形成時期を特定する手がかりを得ることは現状では困難である。

TAUT と GAT-3 遺伝子は脊椎動物においては GAT-1 遺伝子と同一染色体に近接して存在することがわかっている。これらの遺伝子が近接して存在することを利用して、ゲノム DNA から GAT-1 とともにその近隣領域の配列を単離することができれば、TAUT や GAT-3 の遺伝子も単離することができると考えられる。これら遺伝子のシンテニーが種間を問わず保存されているならば、この方法により前口動物から TAUT 遺伝子を、また、GAT-3 をもつ可能性の高い生物を検討し、その生物から GAT-3 遺伝子を単離することが可能だと考えられる。

これまでの解析の結果から、少なくとも GAT-2 と GAT-4 は脊椎動物の祖先で 2 回起こったと考えられる全ゲノム重複時に形成された可能性が高いことがわかった。全ゲノム重複は脊椎動物全ての共通祖先と有顎脊椎動物の共通祖先で起こったと考えられている (Kasahara 2007)。いずれかのゲノム重複時に形成されたかを特定するには、例えばヤツメウナギと魚類の中では最も原始的なサメ等から GAT-2 と GAT-4 の遺伝子を同定することで答えが得られると考えられる。

### 5-2-3. GAT-1 の機能解析

分子系統樹により、シチヨウシンカイヒバリガイとナンキョクオキアミの GAT-1 は、他の生物の GAT-1 と近縁であることがわかったが、実際に GAT-1 としての機能を持つかを検証する必要がある。これら前口動物の GAT-1 の機能を明らかにして TAUT との機能を比較することにより、機能の系譜が明確になることが期待される。とくに、本研究で GAT-1 を単離した、シチヨウシンカイヒバリガイや、同じイガイ科に属するムラサキイガイでは TAUT の機能に関する研究例があり、これらの種で GAT-1 の機能を調べることで、両者の機能分化について知見が得られるのではないかと考えた。そのために、アフリカツメガエル卵母細胞を用いて、組換え輸送体を発現させ、放射性同位体のトリチウム ( $^3\text{H}$ ) で標識した GABA、タウリン、ヒポタウリン等の取り込みを検証して、輸送特性を明らかにしたい。また、各組織を逆転写 PCR により GAT-1 がどの組織で強く発現しているかを解析するとともに、*in situ* ハイブリダイゼーション法を用いて、どの細胞に GAT-1 が存在するかを明らかにして、TAUT と発現部位を比較したい。

さらに、シチヨウシンカイヒバリガイの GAT-1 の環境適応への関与も検証したい。昆虫や *C. elegans* の GAT-1 は、哺乳類の GAT-1 と同様に GABA 作動性ニューロンに存在し、神



## 謝辞

本研究を行うに当たり、終始適切な助言を賜り、また丁寧に指導して下さった東京大学大気海洋研究所・分子生物学分野の井上広滋准教授に深く感謝致します。また、同研究室の西田睦教授、馬渕浩二助教、武島特任助教には、分子系統解析や修士論文の作成に際して様々なご助言を頂くとともに、実験環境を提供して頂きました。厚くお礼申し上げます。海洋生態系動態部門・底生生物分野の小島茂明教授には、副査として貴重なご助言を多く頂き、心から感謝申し上げます。

オーストラリア南極局 (Australian Antarctic Division, Kingston, Tasmania) 所属の Dr. So Kawaguchi には、試料として用いたナンキョクオキアミの個体を提供して頂きました。日本大学の日本大学生物資源科学部・海洋生物資源科学科・海洋環境学研究室の小糸智子助教には、GAT グループの分子進化に関する多くの情報を提供して頂きました。同研究室の外国人研究員のソン・ハヨン博士には、分子系統樹の構築方法に際して、ご指導して頂きました。行動生態計測分野の井上潤博士には、分子系統樹構築に必要なデータの収集にご協力して頂きました。同研究室の日下部郁美博士には、実験に関する様々な助言を頂きました。農学研究科の修士課程 2 年の長崎稔拓氏には、分子実験の経験が少ない私に、一から丁寧に実験のご指導をして頂きました。惜しめない協力をして頂いた以上の方々に、この文面を借りて、改めて敬意を表します。

また、研究で関わった以上の方々と、そして 2 年間の研究生生活を支えて下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、深く感謝致します。

最後に、修士課程に進学することを賛成し、研究生生活を支援して下さいました祖父母の金城松雄と喜久子、父・薫、母・里美、友人に心から感謝致します。

## 引用文献

- Borden, L. A., Smith, K. E., Hartig, P. R., Brancheck, T. A. and Weinshank, R. L. (1992): Molecular heterogeneity of the  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) transport system. *J Biol Chem*, 267: 21048-21104.
- Borden, A. L. (1996): GABA transporter heterogeneity: pharmacology and cellular localization. *Neurochem.Int.*, 29: 335-356.
- Borden, L. A., Smith, K. E., Gustafson, E. L., Branchek, T. A. and Weinshank, R. L. (1995): Cloning and expression of a betaine/GABA transporter from human brain. *J. Neurochem.*, 64: 977-984.
- Bröer S. (2006): The SLC6 orphans are forming a family of amino acid transporters. *Neurochem. Int.*, 48: 559-567.
- Capella-Gutierrez, S., Silla-Martinez, J.M. and Gabaldon, T. (2009): TrimAl: a tool for automated alignment trimming in large-scale phylogenetic analyses. *Bioinformatics*, 25: 1972–1973.
- Christiansen, B, Meinild, A. K., Jensen, A. A. and Bräuner-Osborne, H. (2007): Cloning and characterization of a functional human gamma-aminobutyric acid (GABA) transporter, human GAT-2. *J. Biol. Chem.*, 282: 19331-19341.
- Conti, F., Minelli, A. and Melone, M. (2004): GABA transporters in the mammalian cerebral cortex: localization, development and pathological implications. *Brain Research/Brain Research Review*, 45: 196-212.
- Dodd, J. R. and Christie, D. L. (2007): Selective amino acid substitutions convert the creatine transporter to a  $\gamma$ -aminobutyric acid transporter. *J. Biol. Chem.*, 282: 15528-33
- 藤倉克則・奥谷喬司・丸山正 (2008) : 潜水調査船が観た深海生物 深海生物研究の現在. 東海大学出版, 神奈川, 122pp.
- Gao, X., McLean, H., Caveney, S. and Donly, C. (1999): Molecular cloning and functional characterization of a GABA transporter from the CNS of the cabbage looper, *Trichoplusia ni*. *Insect. Biochem. Mol. Biol.*, 29: 609–623.



- Hahn, M. K. and Blakely, R. D. (2007): The functional impact of SLC6 transporter genetic variation. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 47: 401-441.
- Hirokawa, T., Boon-Chieng, S. and Mitaku, S. (1998): SOSUI: classification and secondary structure prediction system for membrane proteins. *Bioinformatics*, 14: 378-379.
- Höglund, P. J., Adzic, D., Scicluna, S. J., Lindblom, J. and Fredriksson, R. (2005): The repertoire of solute carriers of family 6: identification of new human and rodent genes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 336: 175-189.
- Hosoi, M., Shinzato, C., Takagi, M., Hosoi-Tanabe, S. and Sawada, H. (2007): Taurine transporter from the giant Pacific oyster *Crassostrea gigas*: function and expression in response to hyper- and hypo-osmotic stress. *Fish. Sci.*, 73: 385–394.
- Hosoi, M., Takeuchi, K., Sawada, H. and Toyohara, H. (2005): Expression and functional analysis of mussel taurine transporter, as a key molecule in cellular osmoconforming. *J Exp Biol.*, 208: 4203-4211.
- Inoue, K., Tsukuda, K., Koito, T., Miyazaki, Y., Hosoi, M., Kado, R., Miyazaki, N. and Toyohara, H. (2008): Possible role of a taurine transporter in the deep-sea mussel *Bathymodiolus septemdierum* in adaptation to hydrothermal vents. *FEBS Letters*, 582: 1542-1546.
- Jiang, G., Zhuang, L., Miyauchi, S., Miyake, K., Fei, Y.J. and Ganapathy, V. (2005): A Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> coupled GABA transporter, GAT-1, from *Caenorhabditis elegans*: structural and functional features, specific expression in GABAergic neurons, and involvement in muscle function. *J. Biol. Chem.*, 280: 2065–2077.
- John F., Pilsum, V., Taylor, D. and Bans, L. (1975): Studies on the uptake of creatine from sea water by the marine annelid, *Glycera dibranchiate*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 51:611–617.
- Kasahara, M. (2007): The 2R hypothesis: An update. *Curr. Opin. Immunol.*, 19: 547-552.
- Katoh, K., Asimenos, G. and Toh, H. (2009): Multiple alignment of DNA sequences with MAFFT. *Methods. Mol. Biol.*, 537: 39-64.

- Koito, T., Morimoto, S., Toyohara H., Yoshida, T., Jimbo, M., Maruyama, T., Miyazaki, N. and Inoue, K. (2010a): Decline in taurine transporter mRNA and thioautotrophic bacterial 16S rDNA levels after transplantation of the hydrothermal-vent mussel *Bathymodiolus septemdierum* to a non-vent position. *Cah. Biol. Mar.*, 51: 429-433.
- Koito, T., Nakamura-Kusakabe, I., Yoshida, T., Maruyama, T., Omata, T., Miyazaki, N. and Inoue, K. (2010b): Effect of long-term exposure to sulfides on taurine transporter gene expression in the gill of the deep-sea mussel *Bathymodiolus platifrons*, which harbors a methanotrophic symbiont. *Fish. Sci.*, 76: 382-388.
- Kristensen, S. A., Andersen, J., Jørgensen, N. T., Sørensen, L., Eriksen, J., Loland, J.C., Strømgaard, K. and Gether, U. (2011): SLC6 Neurotransmitter Transporters: Structure, Function, and Regulation. *Pharmacol. Rev.*, 63: 585-640.
- Mbungu, D., Ross, L. S. and Gill, S. S. (1995): Cloning, functional, expression, and pharmacology of a GABA transporter from *Manduca sexta*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 318: 489-497.
- Naruse, K., Tanaka, M., Mita, K., Shima, A., Postlethwait, J., and Mitani, H. (2004): A medaka gene map: The trace of ancestral vertebrate protochromosomes revealed by comparative gene mapping. *Genome Res.*, 14: 820-828.
- Neckameyer, W. S. and Cooper, R. L. (1998): GABA transporters in *Drosophila melanogaster*: cloning, behavior, and physiology. *Invert. Neurosci.*, 3: 279-294.
- Ogoshi, M, Inoue, K, Naruse, K. and Takei Y. (2006): Evolutionary history of the calcitonin gene-related peptide family in vertebrates revealed by comparative genomic analyses. *Peptides*, 27: 3154–3164.
- 御興 真穂 (2009) : 硬骨魚真骨類における新規アドレノメデュリンファミリーの分子進化および生理学的研究. *比較内分泌学*, 35: 109-118.
- Peral, M. J., Garcia-Delgado, M., Calonge, M. L., Duràn, J. M., De La Horra, M. C., Wallimann, T., Speer, O. and Ilundàin, A. (2002): A. Human, rat and chicken small intestinal Na<sup>+</sup> - Cl<sup>-</sup> -creatine transporter: functional, molecular characterization and localization. *J. Physiol.*, 545: 133-144.

- Postlethwait, J. H., Yan, Y. L., Gates, M. A., Horne, S., Amores, A., Brownlie, A., Donovan, A., Egan, E. S., Force, A., Gong, Z., Goutel, C., Fritz, A., Kelsh, R., Knapik, E., Liao, E., Paw, B., Ransom, D., Singer, A., Thomson, M., Abduljabbar, T. S., Yelick, P., Beier, D., Joly, J. S., Larhammar, D., Rosa, F., Westerfield, M., Zon, L. I., Johnson, S. L. and Talbot, W. S. (1998) : Vertebrate genome evolution and the zebrafish gene map. *Nat. Genet.*, 18: 345-349.
- Pruski, A. M. and Fiala-Médioni, A. (2003): Stimulatory effect of sulphide on thiotaurine synthesis in three hydrothermal-vent species from the East Pacific Rise. *J. Exp. Biol.*, 206: 2923-2930.
- 佐藤行人・西田 睦 (2009) : 全ゲノム重複と魚類の進化. 魚類学雑誌, 56: 89-109.
- 茂里康・島本啓子 (2006) : 抑制性神経伝達物質トランスポーターの薬理学. 日薬理誌, 127: 279-287.
- Snow, R. J. and Murphy, R. M. (2001): Creatine and the creatine transporter: a review. *Mol. Cell. Biochem.*, 224: 169-181.
- Stamatakis, A. (2006): RAxML-VI-HPC: Maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics*, 22: 2688–2690.
- Stamatakis, A., Hoover, P. and Rougemont, J. (2008): A rapid bootstrap algorithm for the RAxML web-servers. *Syst. Biol.*, 57: 758–771.
- Takeuchi, K., Toyohara, H. and Sakaguchi, M. (2000): A hyperosmotic stress-induced mRNA of carp cell encodes Na(+)- and Cl(-)-dependent high affinity taurine transporter. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1464: 219-230.
- Takeuchi, K., Toyohara, M., Kinoshita, M. and Sakaguchi, M. (2001): Ubiquitous increase in taurine transporter mRNA in tissues of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) during high-salinity adaptation. *Fish Physiol. Biochem.*, 23: 178-182.
- Thimman, M. S, Berg, J. S. and Stuart, A. E. (2006): Title. Comparative sequence analysis and tissue localization of members of the SLC6 family of transporters in adult *Drosophila melanogaster*. *J. Exp. Biol.*, 209: 3383-404

- Tomi, M., Tajima, A., Tachikawa, M. and Hosoya, K. (2008): Function of taurine transporter (Slc6a6/TauT) as a GABA transporting protein and its relevance to GABA transport in rat retinal capillary endothelial cells. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1778: 2138-2142.
- Toyohara, H., Yoshida, M. Hosoi, I. and Hayashi, I. (2005): Expression of taurine transporter in response to hypo-osmotic stress in the mantle of Mediterranean blue mussel. *Fish. Sci.*, 71: 356-360.
- Uchida, S., Kwon, H. M., Yamauchi, A., Preston, A. S., Marumo, F. and Handler, J. S. (1992): Molecular cloning of the cDNA for an MDCK cell Na(+)- and Cl(-)-dependent taurine transporter that is regulated by hypertonicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 89: 8230-8234.
- Wright, S. H. and Secomb, T. W. (1984) Epidermal taurine transport in marine mussels. *Am. J. Physiol.*, 247: R346-R355.
- Yancey, P. H. (2005): Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses. *J Exp. Biol.*, 208: 2819-2830.

# Appendix



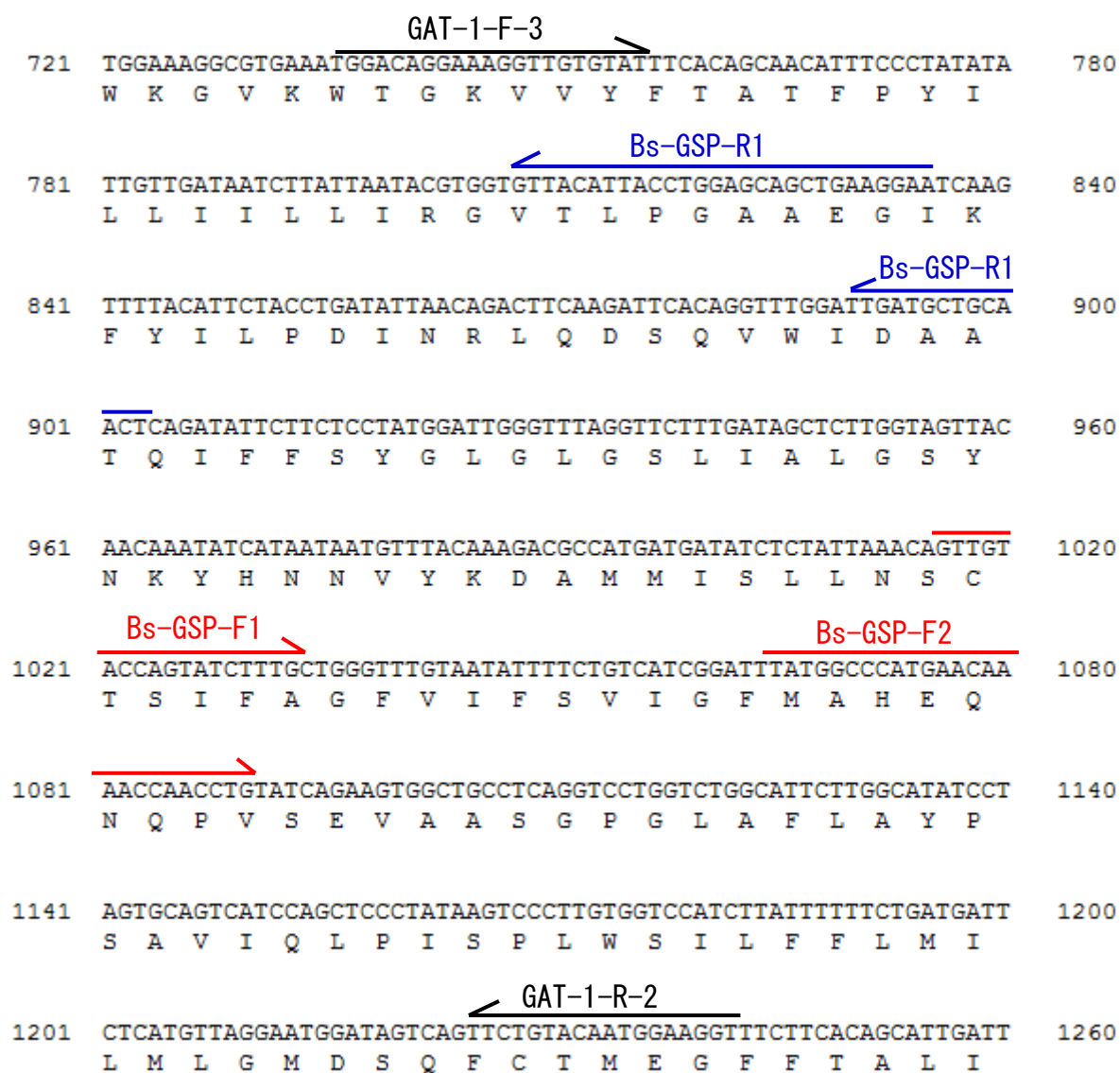


図2. シチヨウシンカイヒバリガイの GAT-1cDNA のクローニングに使用した degenerate PCR および RACE 用プライマーの位置  
黒い線は degenerate プライマーの位置を表し、青色と赤色の線はそれぞれ 5' RACE と 3' RACE 用のプライマーを表す。矢印は増幅される方向を示す。

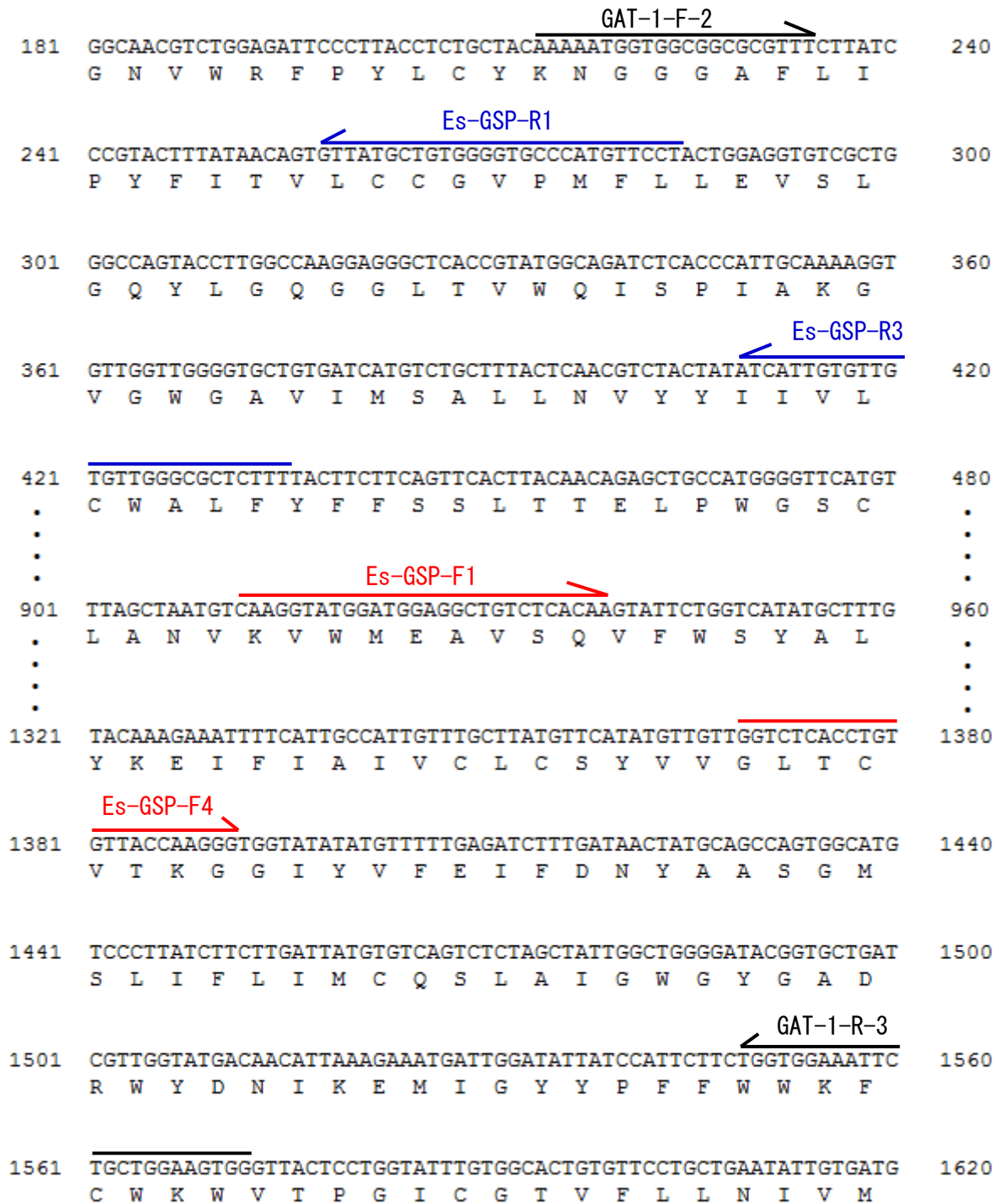


図 3. ナンキョクオキアミの GAT-1cDNA のクローニングに使用した degenerate PCR および RACE 用プライマーの位置  
黒い線は degenerate プライマーの位置を表し、青色と赤色の線はそれぞれ 5' RACE と 3' RACE 用のプライマーを表す。矢印は増幅される方向を示す。



表 1. GAT-1 単離用 degenerate プライマー

方向	プライマー名	塩基配列
Forward	GAT1-F-1	GGNAYGTNTGGMANTTYCCNTA
Forward	GAT1-F-2	AARAAYGGNGGNGGNGCNTT
Forward	GAT1-F-3	TGGACNGGNAARGTNGTNTA
Reverse	GAT1-R-1	TANACNACYTTNCCNGTCCA
Reverse	GAT1-R-2	CCYTCNAYNGTRCARAAYTG
Reverse	GAT1-R-3	CCARCANARYTTCCACCA

表 2. シチヨウシンカイヒバリガイ GAT-1 GSP プライマー

方向	プライマー名	塩基配列
Forward	BS-GSP-F1	TTCACAGGTTTGGATTGATGCTGCAACT
Forward	BS-GSP-F2	TTATGGCCCATGAACAAAACCAACCTG
Forward	BS-GSP-F3	CTCGGGTCCTGGTCTGGCATTCTTGG
Forward	Bs-GSP-F4	TGGGCTCATGTTGTTGGTGGTTTCATGG
Forward	Bs-GSP-F5	GGACATAACATAAAAAACAGTCATGCAG
Forward	Bs-GSP-F6	ATGCAGATAGAGAAATATGAACCTCGAAC
Forward	Bs-GSP-F7	ATGGACAGGAAAGGTTGTGTATTTT
Reverse	BS-GSP-R1	TTCCTTCAGCTGCTCCAGGTAATGTAAC
Reverse	BS-GSP-R2	TGAGTTGCAGCATCAATCCAAACCTGTG
Reverse	BS-GSP-R3	CAAACCCAGCAAAGATACTGGTACAAC
Reverse	Bs-GSP-R5	GGCTTTTTTAATTACCTCATACAGAAGATA
Reverse	Bs-GSP-R6	CCATTGTACAGAACTGACTATCCA

表 3. ナンキョクオキアミ GAT-1 GSP プライマー

方向	プライマー名	塩基配列
Forward	Es-F1	GCTGTATCTGGCTGGATTG
Forward	Es-F2	TGTATCACCTCTTTGGTCTCTGC
Forward	ES-GSP-F1	CAAGGTATGGATGGAGGCTGTCTCACA
Forward	ES-GSP-F2	TCCTGTACGTCGTTGTTTGCTGGTTTTG
Forward	ES-GSP-F3	TGTGCTTGGATTCATGGCAGTTTCACA
Forward	Es-GSP-F4	GGTCTCACCTGTGTTACCAAGGGTGG
Forward	Es-GSP-F5	AGCTATTGGCTGGGGATACGGTGCTGATCG
Forward	Es-GSP-F6	GCACTTGGAGTGGGAAAGTCAGAGT
Forward	Es-GSP-F7	TGCTTGGTGA CTTGAACAGGACCTA
Reverse	ES-GSP-R1	AGGAACATGGGCACCCACAGCATAAC
Reverse	ES-GSP-R2	GATCTGCCATACGGTGAGCCCTCCTTG
Reverse	ES-GSP-R3	AAAGAGCGCCCAACACAACACAATGAT
Reverse	Es-GSP-R7	GCTAATTGCATTGACCTTACATTTTCCA
Reverse	Es-GSP-R8	GAATGTTACTTTGATCCTTTTGTGTGC
Reverse	Es-R1	ACTCCTCGGATAAGCAGAATGAA
Reverse	Es-R2	GAAGCACCAGGAAGCGTCAC

表 4. 分子系統樹に使用したデータの Protein Accession Numbers (Ensembl)

データベース	Operational Taxonomic Unit (OTU)	Accession #
Ensembl	ヒト DAT-1	ENSP00000399806
Ensembl	アフリカツメガエル CT1	ENSXETP00000016798
Ensembl	アフリカツメガエル ENSXETP00000026439	ENSXETP00000026439
Ensembl	アフリカツメガエル GAT-4	ENSXETP00000007854
Ensembl	アフリカツメガエル TAUT	ENSXETP00000025223
Ensembl	アフリカツメガエル GAT-2	ENSXETP00000007859
Ensembl	カタユウレイボヤ ENSCINP00000017436	ENSCINP00000017436
Ensembl	グリーンアノール CT1	ENSACAG00000008691
Ensembl	グリーンアノール GAT1	ENSACAG00000010020
Ensembl	グリーンアノール GAT2	ENSACAG00000000035
Ensembl	グリーンアノール GAT3	ENSACAG00000009875
Ensembl	グリーンアノール GAT4	ENSACAG00000025590
Ensembl	グリーンアノール TAUT	ENSACAG00000013426
Ensembl	ニワトリ ENSGALP00000010357	ENSGALP00000010357
Ensembl	ニワトリ GAT-1	ENSGALP00000007859
Ensembl	ニワトリ GAT-2	ENSGALP00000002166
Ensembl	ニワトリ GAT-3	ENSGALP00000007775
Ensembl	ニワトリ GAT-4	ENSGALP00000002163
Ensembl	ヒト CT1	ENSP00000329205
Ensembl	ヒト GAT-1	ENSP00000287766
Ensembl	ヒト GAT-2	ENSP00000339260
Ensembl	ヒト GAT-3	ENSP00000254488
Ensembl	ヒト GAT-4	ENSP00000352702
Ensembl	ヒト TAUT	ENSP00000398063
Ensembl	マウス CT1	ENSMUSP00000033752
Ensembl	マウス GAT-1	ENSMUSP00000032454
Ensembl	マウス GAT-2	ENSMUSP00000066779
Ensembl	マウス GAT-3	ENSMUSP00000032451
Ensembl	マウス GAT-4	ENSMUSP00000032200
Ensembl	マウス TAUT	ENSMUSP00000032185
Ensembl	ミドリフグ GAT-4	ENSTNIP00000013967
Ensembl	メダカ CT1	ENSORLP00000023265
Ensembl	メダカ GAT-1(1/2)	ENSORLP00000005782
Ensembl	メダカ GAT-1(2/2)	ENSORLP00000014553
Ensembl	メダカ GAT-2 (1/2)	ENSORLP00000014406
Ensembl	メダカ GAT-2 (2/2)	ENSORLP00000002874
Ensembl	メダカ GAT-3	ENSORLP00000005835
Ensembl	メダカ GAT-4	ENSORLP00000018549
Ensembl	メダカ TAUT (1/2)	ENSORLP00000012013
Ensembl	メダカ TAUT (2/2)	ENSORLP00000012690
Ensembl	イトヨ GAT-1(1/2)	ENSGACP00000020006
Ensembl	イトヨ GAT-1(2/2)	ENSGACP00000009664
Ensembl	イトヨ TAUT (1/2)	ENSGACP00000003585
Ensembl	イトヨ GAT-2 (1/2)	ENSGACP00000025110
Ensembl	イトヨ GAT-2 (2/2)	ENSGACP00000004766
Ensembl	イトヨ GAT-3 (1/2)	ENSGACP00000009605
Ensembl	ヤツメウナギ ENSPMAP00000004838	ENSPMAP00000004838
Ensembl	ヤツメウナギ ENSPMAP00000002315	ENSPMAP00000002315

表 5. 分子系統樹に使用したデータの Protein Accession Numbers (NCBI)

データベース	Operational Taxonomic Unit (OUT)	Accession #
NCBI	Raja sp. GABA transporter	AAC05185.1
NCBI	アメリカムラサキウニ XP_787028	XP_787028
NCBI	イラクサギンウワバ GAT-1	AAF70819.1
NCBI	カタユウレイボヤ XP_002120359.1	XP_002120359.1
NCBI	キイロショウジョウバエ GAT-1	AAQ22469.1
NCBI	ゴマフシビレイエ GAT-1	CAA54394.1
NCBI	シチヨウシンカイヒバリガイ TAUT	AB371309
NCBI	シビレイエ GABA beta-alanine transporter	CAA60635.1
NCBI	ジャンボアメフラシ TAUT	NP_001191394
NCBI	セイヨウミツバチ GAT-1	AAQ96727.1
NCBI	<i>C. elengans</i> GAT-1	ABF20555.1
NCBI	タイセイヨウサケ GAT-2	ACN11066.1
NCBI	タバコスズメガ GAT-1	AAA92342.1
NCBI	ヘイトウシンカイヒバリガイ TAUT	AB513188
NCBI	マガキ TAUT	BAE80716.1
NCBI	ムラサキイガイ TAUT	BAD91313.1