

## 論文の内容の要旨

論文題目      Functional evolution of the GABA transporter group in deep-sea mussels  
                          (深海性イガイ類における GABA 輸送体グループの機能進化)

氏 名 角村（金城） 梓

## 緒言

環境中に高濃度に硫化水素を含む熱水噴出域は、生物にとって地球上で最も過酷な環境の一つである。しかし、そこには高密度の生物群集が形成されている。近年、海底熱水鉱床の開発が注目されている一方で、そこに生息する貴重な生態系への影響が懸念されている。熱水噴出域の生物は、進化の過程で特殊な環境に適応してきた固有種である。生物がもつ環境適応機構の獲得過程を知ることは、生態系の理解や適切な保全のための基礎的な知見になるものと期待される。

近年、タウリン輸送体（TAUT）と呼ばれる輸送体が、硫化水素を無毒化するヒポタウリンやチオタウリンという物質を細胞内に輸送することにより、熱水噴出域環境中の硫化水素の無毒化を可能としていることが深海性イガイ類において示唆されている。TAUTの機能の研究が進んでいる一方で、この分子自体の進化の過程はこれまでわかっていなかった。

TAUT には共通祖先から生じた姉妹分子が存在し、これらは GABA 輸送体 (GAT) グループと呼ばれている。このグループには、脊椎動物では TAUT の他に、クレアチン輸送体 (CT1) と 4 種類の GABA 輸送体 (GAT-1, GAT-2, GAT-3, GAT4) が同定されているが、各輸送体の進化過程はわかっていない。また、深海性イガイ類において TAUT 以外のメンバーの存在や機能がわかっていないため、TAUT が GAT グループの中でどのように生じ、機能が進化してきたか不明であった。

本研究では、深海性イガイ類の環境適応に重要な TAUT の進化を解明するため、GAT グループ全体の分子進化の過程を解明し、各種動物における GAT グループの分布を明らかにした（第一章）。これにより、深海性イガイ類における GAT-1 の存在が明らかとなり、また、TAUT は分子系統学的に脊椎動物の CT1 と相同であることを示した。そこで次に、GAT-1 の機能（第二章）と TAUT の CT1 としての機能を検証した（第三章）。材料には、熱水噴

出域の代表種のシチヨウシンカイヒバリガイを用いた。これらの結果をもとに、深海性イガイ類における GAT グループの機能進化について考察した。

## 第一章 GABA 輸送体グループの分子進化

これまで二枚貝では TAUT の存在のみが報告されていた。しかし、同じ前口動物の別の種に GAT-1 が存在することから、前口動物と後口動物の共通祖先で GAT-1 と TAUT の 2 つが誕生したことが考えられた。そこで、TAUT の存在が既知のシチヨウシンカイヒバリガイおよびナンキョクオキアミから GAT-1 cDNA の単離を試み、得られた配列を用いて分子系統解析ならびにシンテニー解析を行った。その結果、両種から得られた GAT-1 様配列は他の生物の GAT-1 と分子系統学的に相同であることがわかった。また、二枚貝の TAUT は、分子系統学的には脊椎動物の TAUT ではなく CT1 と相同であることが示された（以下、CT1 と称する）。これにより、前口動物と後口動物が分岐する以前に GAT-1 と CT1 が生じことが示された。さらに CT1 遺伝子の系統から TAUT、GAT-3、最後に GAT-2 と GAT-4 遺伝子が分岐したことが示された。シンテニー解析により、GAT-2 と GAT-4 のどちらかの遺伝子は脊椎動物の祖先で起こった染色体重複の際に生じたことが示唆された。

## 第二章 深海性イガイ類の GAT-1 の機能解析

上記から得られたシチヨウシンカイヒバリガイ GAT-1 (BsGAT-1) の機能を解明するため、輸送特性と発現組織を調べた。輸送特性は、アフリカツメガエルの卵母細胞に GAT-1 を発現させ、トリチウムで標識した<sup>[3H]</sup> GABA の取り込み量を測定することにより調べた。その結果、BsGAT-1 は、NaCl 依存的に GABA を輸送することがわかり、また、その輸送は GAT-1 特異的阻害剤によって阻害されたことから、機能的にも脊椎動物の GAT-1 と相同であることが示された。また、GAT-1 のミカエリス・メンテン定数 (Km 値) は 0.57 μM であり、また最大反応速度 (Vmax) は 1.98 pmol/(oocyte · h) であったことから、他の生物に比べ GABA に対する親和性が高いものの、輸送速度は遅いことがわかった。さらに、GAT-1 の基質特異性を調べるため、取り込み実験系に、<sup>[3H]</sup> GABA と 100 倍量の非標識アミノ酸類縁化合物を加え、競合阻害実験を行った。その結果、<sup>[3H]</sup> GABA の取り込み量に有意な差は見られなかったものの、ヒポタウリンは <sup>[3H]</sup> GABA の取り込みを 42.2% に低下させた。さらに、加えるヒポタウリンの量を増やしてみると、<sup>[3H]</sup> GABA の取り込み低下は統計的に有意になったことから、BsGAT-1 はヒポタウリンに親和性をもつことが示された。

逆転写 PCR により BsGAT-1 遺伝子の発現分布を調べたところ、様々な組織での発現がみられた。特に生殖腺、前閉殻筋、後閉殻筋、唇弁などで強く発現していた。哺乳類の GAT-

1 は神経細胞特異的に発現していることや、2 つの閉殻筋と唇弁などの組織の近傍には神経節が存在することが近縁のムラサキイガイで知られていることから、BsGAT-1 は神経で機能することが推測された。しかし、他の様々な組織でも発現が認められることから、神経以外での機能も示唆された。先の結果により、GAT-1 はヒポタウリンに親和性をもつことが示されたことから、様々な組織でヒポタウリンの輸送を担い、硫化水素無毒化機構に関与していることが推測された。

### 第三章 深海性イガイ類の CT1 のクレアチンに対する親和性

シチヨウシンカイヒバリガイ CT1 (BsCT1) は分子系統学的には CT1 であるが、そのクレアチン輸送能はこれまで明らかとなっていなかった。そこで、GAT-1 同様にアフリカツメガエルの卵母細胞に BsCT1 を発現させて、 $[^3\text{H}]$ タウリンと非標識のクレアチンを用いて競合阻害実験により輸送特性を調べた。その結果、BsCT1 はクレアチンを輸送しないことが示唆され、哺乳類の CT1 とは機能が大きく異なることがわかった。輸送機能に重要と考えられているアミノ酸残基を哺乳類とシチヨウ CT1 の間で比較すると、哺乳類 CT1 のシステイン (144 番目) とアラニン (318 番目) が、BsCT1 では、ロイシンとセリンにそれぞれ変異していた。これらのアミノ酸残基の違いが機能の違いを生じていると考え、BsCT1 のロイシンおよびセリン残基を、それぞれシステインおよびアラニンに片方または両方置換し、 $[^{14}\text{C}]$ クレアチンの取り込み量を測定した。その結果、システイン変異体と二重変異体においてクレアチンの取り込み量が有意に増加した。アラニン変異体では、取り込み量増加はわずかであった。このことから、ロイシンからシステインへの変異により、脊椎動物型の CT1 はクレアチン輸送体としての機能を獲得したと考えられた。

### 総合考察

本研究により解明された GAT グループの進化の歴史は以下の通りである。前口動物と後口動物の共通祖先で、GAT グループの祖先分子の遺伝子重複により、最初に GAT-1 と CT1 が生じた。GAT-1 は、生命の維持に重要な神経での働きを担っていたため機能的制約がかかり、深海性イガイ類を含む多くの生物において機能は大きくかわることなく保存された。GAT-1 に対して、CT1 は機能的制約から逃れ自由に機能を進化していった。ヒポタウリンやチオタウリン、タウリン輸送能を獲得した一方、脊椎動物の進化過程ではクレアチンを輸送するように進化した。ホヤ以降の生物の CT1 で、哺乳類の 144 番目に相当するアミノ酸残基にシステインが存在することから、クレアチンの輸送能は脊索動物以降に出現したと考えられた。その後、脊椎動物への進化過程で、TAUT、GAT-3、GAT-2、GAT-4 が誕生し、脊椎動物

では GAT グループは多様化していった。一方、深海性イガイ類を含む前口動物のグループには GAT-1 と CT1 の 2 つの輸送体のみが保持され、2 つで様々な機能を担うように進化していったと考えられる。

深海性イガイ類では、GAT-1 は基本的な性質を保持しつつも、ヒポタウリンも輸送するように進化していったと推測された。脊椎動物に比べ、貝は神経系が単純なため、GABA に特化する必要がなく、機能的制約が緩んでいったと考えられる。その結果、BsGAT-1 は神経細胞以外でヒポタウリンを輸送して CT1 の機能をサポートし、熱水噴出域への適応に有利になるように進化していったのではないかと考えられた。

機能的制約の緩い CT1 の系譜は、タウリン、ヒポタウリン、チオタウリンと複数の物質を運ぶよう GAT グループの中で進化した。イガイ類が浅海から熱水噴出域へ進出する際に、CT1 の基質特異性の広さが環境適応に有利に働いたことが考えられた。すなわち、浅海で浸透圧調節のためにタウリンを輸送していた CT1 を、そのままヒポタウリンやチオタウリンの輸送に利用することができたため、比較的容易に環境に適応できたのではないかと推測された。

以上のように深海性イガイ類の環境適応に重要な輸送体は、CT1 に起源をもち、祖先遺伝子の重複により GAT-1 から分岐した後、自由に機能を変えることによって、熱水噴出域の環境適応に貢献してきたと考えられる。