

# 二枚貝類における新規二価金属イオン輸送体の探索と機能解析

2015年3月 自然環境海洋生命環境学分野 47-136615 佐々三依子  
指導教員 井上広滋 教授

キーワード：二価金属イオン輸送体 (DMT1)、重金属、二枚貝

## 1. はじめに

生物は多様な環境に適応するために独自の適応機構を獲得しつつ進化してきた。その中でも貝類は、その生息可能な環境の多様さから、地球上でもっとも繁栄している生物群のひとつであるといわれているが (佐々木 2010)、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。

金属イオンの制御に関与するタンパク質として、二価金属イオン輸送体 (divalent metal transporter1; DMT1) が哺乳類において知られている。DMT1 は、多くの二価金属を輸送することが知られている。一方、近年ホタテガイからも DMT1 に似た輸送体の cDNA が単離され、ホタテガイ DMT と命名された。ホタテガイ DMT は哺乳類の DMT1 とは異なる性質を持ち、貝殻形成に関与している可能性が示唆された (Toyohara *et al.* 2005)。また、貝類が不要な金属を貝殻に排出するという、「硬組織ゴミ箱説」も提唱されている (大越 2001)。

本研究では、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* を研究対象に選んだ。本種の生息する熱水噴出域の海水は金属元素成分を多く含むという特徴を持つため、本種は重金属に対する適応機構を発達させていることが予想される。

私は卒業研究において本種において DMT 遺伝子を探索し、DMTcDNA と、DMT に類似する新規遺伝子の部分配列の取得に成功し、DMT-related protein (DMTRP) と命名した (佐々 2013)。貝類は、貝殻形成や、環境中の重金属への適応において、DMT と DMTRP を使い分けることで対応している可能性が考えられる。

本研究では、両者の使い分けを明らかにするための第一段階として、シチヨウシンカイヒバリガイの DMTRP の全長配列を取得してその一次構造を解明した。続いて、DMT および DMTRP がどのような生物に存在するかをデータベースから探索した。また、分子系統解析により DMT と DMTRP の関係を考察した。さらに、両遺伝子の発現組織を比較するとともに、シチヨウシンカイヒバリガイを実験的に種々の重金属に曝露して、対する主な組織における DMT 遺伝子の発現応答を定量的リアルタイム PCR により解析した。

## 2. 試料と方法

シチヨウシンカイヒバリガイの既を取得した DMTRP 部分配列から特異的プライマーを設計し、PCR 法および RACE 法により全長配列を取得し、演繹される一次構から膜貫通部位の予測を行った。また、他の貝類における DMT 様遺伝子の存在を、データベースから検索するとともに、DMT 及び DMTRP の関係を、分子系統解析により解明した。次に、機能に関する情報を得るために、15 組織について RT-PCR による発現組織特異性解析を

行った。さらに、重金属による発現応答解析のため、それぞれ水銀・カドミウム・鉛・銅・鉄・亜鉛を含む人工海水中に本種を曝露し、定量的 PCR により各組織における DMT 遺伝子の発現量を測定した。

### 3. 結果と考察

シチヨウシンカイヒバリガイにおける DMTRP の cDNA 全長配列を単離した結果、長さの異なる 2 種類の配列を取得した。長い方は 523 残基の ORF を含む配列であったが、短い方の配列は長い方の配列から 70 塩基が欠失したものであった。短い方の配列をアミノ酸に翻訳すると早い段階で終止コドンが出現し、タンパク質としての機能を持っていないと考えられたので、長い方の配列に対してのみ解析を行った。DMT との相同性は 50.29% で、膜貫通部位の予測を行った結果、ヒト DMT1 と同様、12 か所の膜貫通部位を持ち、C 末端と N 末端が細胞内に突出するという特徴を持つことがわかった。ヒト DMT1 において示唆されている、機能上重要な役割を持つアミノ酸残基やモチーフも高く保存されていることから、二価金属イオン輸送体としての機能を保持している可能性が示唆された。マガキのデータベースからも DMT および DMTRP に相同な配列が検出され、その一方は GenBank に登録のない新規配列であった。この新規 DMT 様配列は、新規機能を持つことが示唆されたホタテガイ DMT とともに二価金属イオンの取り込み量に関与するアミノ酸残基が変異していたことから、従来知られていない機能を持つ可能性が考えられた。分子系統解析より、既知の各種動物の DMT はシチヨウシンカイヒバリガイ DMT と相同であり、DMTRP はこれまで報告の無い新規の輸送体であることが示された。RT-PCR による発現組織特異性解析の結果、腸管で最も高発現となるヒトやホタテガイと異なり、腸管では低発現であった。これは、本種が栄養を共生させている硫黄細菌に依存しており、自身の消化器官が退化しているからではないかと考えられた。DMT、DMTRP とともに、外套膜および足において高発現であり、外套膜は貝殻形成に関与し、足は足糸を形成する器官であることから、DMT が貝殻形成や、不要な金属を足糸に排出している可能性が示唆された。DMT の重金属暴露による発現応答解析の結果、コントロールに対して発現量が変化する組織及び重金属はなかったものの、腸管と足においてカドミウムと亜鉛に暴露した際の発現量に有意差が見られ、カドミウム暴露時に発現量が低下し、亜鉛暴露時に発現量が上昇する傾向があることが示唆された。

#### 引用文献

佐々木 猛智 (2010) : 貝類学. 東京大学出版会.

Okubo *et al.* (2003) : Cadmium transport by human Nramp 2 expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *Toxicology and Applied Pharmacology* 187 (2003) 162–167.

Toyohara *et al.* (2005) : Scallop DMT functions as a Ca<sup>2+</sup> transporter. *FEBS Letters*, 579 (12): 2727–2730.

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 (2) 、129-135.

佐々 三依子 (2013) : シチヨウシンカイヒバリガイの 2 つ目の二価金属イオン輸送体の発見とその分子系統学的解析、卒業研究 (東邦大学)

# The exploration and functional analysis of a new divalent metal transporter in Bivalvia

Mar.2015 Marine Life Science and Environment 47-136615 Mieko Sassa

Supervisor ; Prof. Koji Inoue

Keyword: divalent metal transporter1 (DMT1), heavy metals, Bivalvia

## 1. Introduction

Organisms have evolved by gaining unique adaptation mechanisms to adapt to diverse environments. Bivalves are recognized to be one of the most successful taxa on the Earth because they are found in wide variety of environments (Sasaki 2010). Metal metabolism is an important factor of their environmental adaptation.

Divalent metal transporter 1 (DMT1) is known to regulate metal ions in mammals. On the other hand, recent study revealed that scallop DMT has different function from mammals and suggested that it relates to their shell formation (Toyohara *et al.* 2005). It is also said that bivalvia discard unnecessary metals to their shells like garbage box (Okoshi 2001).

In my past study I have searched DMT in a hydrothermal-vent specific mussel *Bathymodiolus septemdierum*. I discovered two DMT1-like cDNA fragments: one was a homolog of mammalian DMT1 but the other was a partial fragment encoding new protein that is similar to but different from DMT1. I named the latter DMTRP (DMT-related protein) (Sassa 2013). Co-existence of two similar transporters suggests that they have different functions.

In this study I cloned whole coding region of DMTRP in *B. septemdierum* and analyzed primary structure as the first step to reveal their functions. Next, I screened DNA database to find DMT and DMTRP of other organisms. I also performed molecular phylogenetic analysis. I compared tissue-specificity of DMT and DMTRP genes expression and also response of the two genes to metals by exposing the mussels to several metals and measuring mRNA levels by quantitative PCR.

## 2. Materials and Method

Whole coding region of DMTRP cDNA was obtained by PCR and RACE using specific primers designed from DMTRP fragment. After sequence determination, transmembrane domains were predicted using a computer program. Similar proteins were searched in DNA database, and then molecular phylogenetic analysis was conducted. Tissue distribution of transcripts of the two genes was tested on 15 tissues by RT-PCR. Transcripts of the DMT gene was measured by quantitative real-time PCR after exposure of *B. septemdierum* to mercury, cadmium, lead, copper, iron

and zinc.

### 3. Results and Discussion

I got two different lengths of DMTRP sequences. The longer one contained an ORF of 523 residues. The shorter one was almost the same as the longer one but lacked a 70-base sequence. As the deletion causes frame shift and produces a short translate, further analyses were performed only for longer sequence. Similarity between DMTRP and DMT sequences was 50.29%. Like human DMT1, 12 transmembrane domains were identified with intracellular C and N termini. Almost all functionally important domain and amino residues were highly conserved in DMTRP, suggesting that DMTRP functions as a divalent metal transporter. From the oyster database, two DMT-like sequences were also detected. One was a known DMT registered in GenBank but the other was a new protein. A few amino acid substitutions were observed between DMT and DMTRP even in functionally important positions, suggesting the two similar proteins have different functions. Major expression sites of DMT were mantle and foot whereas that of human DMT1 is intestine. This result may be because of the reduced importance of intestine in *B. septemdierum* as it nutritionally depends mainly on symbiotic bacteria in the gill. Mantle relates to shell formation and foot make byssus that can be a possible medium for metal discharge. Result of quantitative PCR, there is no significant difference between control and metal-exposed groups, but in the intestine and foot, there are significant differences between cadmium-exposed and zinc-exposed groups. Cadmium may decrease and zinc may increase DMT gene expression.

### References

- Sasaki T. (2010): Malacology. University of Tokyo Press. (in Japanese)
- Okubo *et al.* (2003): Cadmium transport by human Nramp 2 expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *Toxicology and Applied Pharmacology* 187: 162–167.
- Toyohara H. *et al.* (2005): Scallop DMT functions as a Ca<sup>2+</sup> transporter. *FEBS Letters*, 579: 2727–2730.
- Okoshi K (2010): Metal accumulation and shell formation in bivalves inhabiting hydrothermal vents. *Kaiyo to Seibutsu* 32: 129-135.
- Sassa M (2013): The discovery and molecular phylogenetic analysis of new divalent metal transporter in *Bathymodiolus septemdierum*, graduation thesis (Toho University).