

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 26 年度 修士論文

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

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

2015 年 1 月 22 日提出

2014 年度 3 月修了

指導教員 井上 広滋 教授

47-136615 佐々三依子



## 目次

1. 背景と目的-----	1
2. 材料と方法-----	3
2-1. シチヨウシンカイヒバリガイからの DMTRP 遺伝子の単離	
2-2. 他の貝類における DMTRP 遺伝子の探索	
2-3. DMT, DMTRP の分子系統解析	
2-4. DMT, DMTRP 遺伝子の組織発現特異性解析	
2-5. シチヨウシンカイヒバリガイの DMT 遺伝子の発現量解析	
3. 結果-----	9
3-1. シチヨウシンカイヒバリガイにおける cDNA の単離	
3-2. 他の貝類における DMTRP 遺伝子の探索	
3-3. DMT、DMTRP の分子系統解析	
3-4. シチヨウシンカイヒバリガイにおける DMT と DMTRP の発現組織特異性解析	
3-5. シチヨウシンカイヒバリガイの DMT 遺伝子の発現量解析	
4. 考察-----	31
4-1. シチヨウシンカイヒバリガイにおける DMTRP の cDNA 単離	
4-2. 他の貝類における DMTRP 遺伝子の探索	
4-3. 分子系統解析	
4-4. シチヨウシンカイヒバリガイの DMT、DMTRP 遺伝子発現の組織特異性	
4-5. シチヨウシンカイヒバリガイの DMT 遺伝子の発現量解析	
5. 今後の展望-----	34
謝辞-----	36
引用文献-----	37

## 1. 背景と目的

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（佐々木 2010）。淡水や汽水に生息する貝であれば、水中のカルシウム不足により貝殻形成が困難になり、海洋汚染の著しい海域や、深海の熱水噴出域などでは重金属に曝露されるなど、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、natural resistance-associated macrophage protein 2 (Nramp2) と呼ばれる、プロトン濃度勾配を駆動力とする共輸送体である (Nevo and Nelson, 2006、Tandy *et al.* 2000)。哺乳類の DMT1 をアフリカツメガエル卵母細胞に発現させ、電気生理学的な解析を行うことにより、DMT1 が鉄  $\text{Fe}^{2+}$ 、マンガン  $\text{Mn}^{2+}$ 、コバルト  $\text{Co}^{2+}$ 、亜鉛  $\text{Zn}^{2+}$ 、カドミウム  $\text{Cd}^{2+}$ 、銅  $\text{Cu}^{2+}$ 、ニッケル  $\text{Ni}^{2+}$ 、鉛  $\text{Pb}^{2+}$  を輸送することが示唆された (Gunshin *et al.* 1997)。また、放射性同位体により標識したイオンの細胞内への取り込み量の測定により、 $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Co}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Cd}^{2+}$  が実際に細胞内に輸送されることが確認された (Sacher *et al.* 2001、Marciani *et al.* 2004、Okubo *et al.* 2003)。ヒトの組織における DMT 1 の最大の輸送対象は  $\text{Fe}^{2+}$  であり、細胞内  $\text{Fe}^{2+}$  濃度の恒常性維持のために細胞内  $\text{Fe}^{2+}$  濃度に応じて発現することともわかっている (Radisky and Kaplan 1999)。

一方、近年ホタテガイからも DMT1 に似た輸送体 (ホタテガイ DMT) の cDNA が単離された。ホタテガイ DMT はカルシウム  $\text{Ca}^{2+}$  を輸送することができ、その遺伝子発現が細胞内  $\text{Fe}^{2+}$  濃度に相関しないことなど、哺乳類の DMT1 とは異なる性質を持つことより、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 (Bourgoin 1990、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。本種は、伊豆・小笠原弧の深海の熱水噴出域の優占種として知られる。熱水噴出域は、海底面下に染み込んだ海水がマグマに加熱されて上昇し、海底から噴出する場所である。熱水噴出域では高水圧のため海水は液体のまま 300~400°C に達する。高温の熱水は岩石や堆積物中の鉱物や火山ガスの成分を溶解して取り込んだり、逆に鉱物を形成させて海水に含まれていた一部の元素を除去する。これらのプロセスを経て、深海底から噴出する熱水は、還元性物質に富み pH が低く、また金属元素成分を多く含む、といった特徴を持つ (藤倉ほか 2012)。このような環境は生物にとって十分過酷であるが、それに関

わらず、そこにはサンゴ礁にも匹敵するバイオマスを持つ生物群集が存在する（井上ほか 2010）。これら生物群集を支えているのが、熱水中に含まれる硫化水素  $\text{H}_2\text{S}$  やメタン  $\text{CH}_4$  を利用して有機物を合成する化学合成細菌である。熱水噴出域で巨大なバイオマスを占めるシチヨウシンカイヒバリガイは、鰓細胞内に硫黄酸化細菌を共生させ、細菌が合成した栄養分を得て生活しているが、化学合成に必要な化学物質を豊富に得るために有害物質の噴出する熱水噴出孔に可能な限り近づく必要がある。このため、本種は、海水に溶解し、あるいは微粒子となって降り注ぐ重金属（大越 2010）に対する適応機構が発達していることが予想される。実際、シンカイヒバリガイ類は、環境中の重金属濃度に応じた濃度の重金属濃縮を行うことが知られているが（Koschinsky *et al.* 2014）、その重金属の収集過程や濃縮の方法は明らかになっていない。また、炭酸カルシウム結晶の形成に不利な酸性環境において、シンカイヒバリガイ類がカルシウムを集めて貝殻を形成するしくみについてもよくわかっていない。

筆者は卒業研究において、シチヨウシンカイヒバリガイにおいて DMT 遺伝子を探索し、DMT と DMT に類似する新規遺伝子の部分配列の取得に成功し、後者を DMT-related protein (DMTRP) と命名した（佐々 2013）。全く同一な機能を持つ遺伝子を複数発現させているとは考えづらいため、例えば両者を使い分けることによって環境中の重金属に対応している可能性が考えられる。

そこで本研究では、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、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. 材料と方法

### 2-1. シチヨウシンカイヒバリガイからの DMTRP 遺伝子の単離

#### 2-1-1. 生物試料

すでに DMT1 遺伝子が単離されているシチヨウシンカイヒバリガイ (*Bathymodiolus septemdierum*) (図 1) を用いた。本研究において用いたシチヨウシンカイヒバリガイは、『なつしま』研究航海 NT14-06 において、独立行政法人海洋研究開発機構 (JAMSTEC) の無人探査船「ハイパードルフィン」により、伊豆小笠原海域の水深約 1,200~1,400 m にある明神海丘 (32°06'N 139°53'E) (図 2) の熱水噴出域から採取された試料は採取後、船上でただちに解剖したのち、使用まで-80°C で凍結保存した。

#### 2-1-2. RNA 抽出と cDNA の合成

Total RNA は組織 (腸管および生殖腺) より TRIsure (BIOLINE, London, UK) を用いて抽出した。Deoxyribonuclease I, Amplification Grade (Invitrogen, Carlsbad, CA) による DNase 処理後、455 ng の total RNA より、SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen) に付属する SuperScriptIII RT を用いて二重鎖 cDNA プールを合成し、これを PCR の際のテンプレート cDNA とした。逆転写の際、oligo dT にアダプター配列を付加したプライマーを作成し、これを 3'-RACE PCR の際のテンプレート cDNA とした。また、同様に DNase 処理後の 455 ng の total RNA より、SMART cDNA Library Construction Kit (Clontech, Palo Alto, CA, USA) に付属する SMARTScribe Reverse Transcriptase を用いて 1st-Strand cDNA 合成し、これを鋳型としてキットのプロトコールに従い、LD-PCR 法によって二本鎖 cDNA を増幅し、これを 5'-RACE PCR の際のテンプレートとした。

#### 2-1-3. プライマーの設計

すでに単離した DMTRP 遺伝子の配列断片 (佐々 2013) と、次世代シーケンサーによる解析から得られた配列断片 (共同研究者により論文投稿準備中) をもとに、それぞれ数種類のフォワード及びリバース鎖 (表 1) を設計した。以降、使用するすべてのプライマー配列は、表 1 に記載する。

#### 2-1-4. シチヨウシンカイヒバリガイの DMTRP 遺伝子の増幅

以下に記述するすべての PCR は、特に記載のない限り、KOD-plus-(TOYOBO, Osaka, 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製した。はじめに、シチヨウシンカイヒバリガイ生殖腺から得られた二本鎖 cDNA を用いて、設計したプライマーのうち TPG-F と TSS-R を用いて、シチヨウシンカイヒバリガイ DMTRP 遺伝子の部分配列の増幅を行った。反応条件は、最初に 94°C で 2 分間変性させたのち、94°C

で 15 秒の熱変性・61°C で 30 秒のアニーリング・68°C で 1 分 20 秒の伸長反応のセットを 35 サイクル行い、35 サイクル目に Ex Taq (Takara Bio, Otsu, Japan) DNA ポリメラーゼを添加し、その後 72°C で 7 分伸長反応を行った。得られた PCR 産物は、2-1-5 に記載する手順でサブクローニングを行い、配列を決定した。

得られた配列の上流及び下流の配列は、5'-および 3'-RACE (Rapid amplification of cDNA Ends) によりそれぞれ単離した。5'-RACE では、2-1-2 において合成した 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 (SMART cDNA Library Construction Kit に付属) と、上記で決定した配列から設計した特異的リバープライマー FSD-R を用いて PCR を行った。反応条件は、最初に 94°C で 2 分間変性させたのち、94°C で 15 秒の熱変性・59°C で 30 秒のアニーリング・68°C で 1 分 30 秒の伸長反応のセットを 35 サイクル行った。その後、この PCR 産物を鋳型にして nested-PCR を行った。まず 5'末端に付加された配列に特異的な配列をもとに設計した 5' PCR inner と、DMTRP 遺伝子特異的リバープライマー sDMTRP-R を用いて Touchdown-PCR 法を行った。反応条件は、最初に 94°C で 2 分間熱変性を行った後、94°C で 15 秒の熱変性・72°C で 30 秒のアニーリング・68°C で 1 分 30 秒の伸長反応のセットを 3 サイクル、94°C で 15 秒の熱変性・69°C で 30 秒のアニーリング・68°C で 1 分 30 秒の伸長反応のセットを 3 サイクル、94°C で 15 秒の熱変性・66°C で 30 秒のアニーリング・68°C で 1 分 30 秒の伸長反応のセットを 25 サイクル行い、25 サイクル目に Ex Taq DNA ポリメラーゼを添加しその後 72°C で 7 分伸長反応を行った。得られた PCR 産物は、2-1-5 に記載する手順でサブクローニングを行い、配列を決定した。

3'-RACE では、DMTRP 遺伝子特異的フォワードプライマー FSD-F と、逆転写の際 oligo dT に付加した配列から設計した NotIADPN1 を用いて PCR を行った。反応条件は、最初に 94°C で 2 分間変性させたのち、94°C で 15 秒の熱変性・60°C で 30 秒のアニーリング・68°C で 1 分 30 秒の伸長反応のセットを 35 サイクル行った。次に、この PCR 産物を鋳型として nested-PCR を行った。まず DMTRP 遺伝子特異的フォワードプライマー TSS-F と、逆転写の際、oligo dT に付加した配列から設計した NotIADPN2 を用いて TD-PCR 法を行った。反応条件は、最初に 94°C で 2 分間熱変性を行った後、94°C で 15 秒の熱変性・63°C で 30 秒のアニーリング・68°C で 1 分の伸長反応のセットを 3 サイクル、94°C で 15 秒の熱変性・60°C で 30 秒のアニーリング・68°C で 1 分の伸長反応のセットを 3 サイクル、94°C で 15 秒の熱変性・57°C で 30 秒のアニーリング・68°C で 1 分の伸長反応のセットを 25 サイクル行い、25 サイクル目に Ex Taq DNA ポリメラーゼを添加し、その後 72°C で 7 分伸長反応を行った。得られた PCR 産物は、2-1-5 に記載する手順でサブクローニングを行い、配列を決定した。

最後に、5'-UTR と 3'UTR に設計したプライマーにより全長を増幅しようと試みたが、欠失配列を持つ配列のみが得られた。しかし、欠失部分に設計したプライマーと 5'-UTR

および 3'-UTR に設計したプライマーとの間では増幅断片が得られるため、長いほうの配列も発現していることは確実である。従って、長いほうについては、5'及び 3'-RACE と部分配列の PCR により得られた配列と、欠失部分から 5'及び 3'-末端までの増幅産物が完全に一致し、それぞれのオーバーラップ部分は数百塩基対であることから、これらをつないだものを全長とした。

#### 2-1-5. サブクローニングとインサートチェック

2-1-4.で得られた PCR 産物は、1%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、QIAquick Spin (QIAGEN, Limburg, Nederland) 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。Competent high DH5α (TOYOBO) を用いた形質転換を行った後、LB 培地上で 37°C で一晩培養した。培養後、T7 と SP6 プライマーを用いて、コロニーダイレクト PCR を行った。この PCR は、AmpliTaq Gold PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, U.S.A) DNA ポリメラーゼを用いて、添付のプロトコールに従って反応液を調製した。反応条件は、95°C で 5 分間熱変性を行った後、95°C で 15 秒の熱変性・55°C で 15 秒のアニーリング・72°C でベクターに挿入された配列断片の長さに応じた伸長反応のセットを 30 サイクル行い、その後 72°C で 7 分間伸長反応を行った。PCR 反応後、得られた PCR 産物全量を 1.5%アガロースゲルを用いて電気泳動を行い、増幅及び PCR 産物のサイズを確認した。

#### 2-1-6. プラスミド抽出

2-1-5.におけるインサートチェックにより、正しいサイズにおける増幅が確認された形質転換体から、FastGene Plasmid Mini Kit (Nippon Genetics Co., LTD., Tokyo, Japan) を用いてプラスミドを抽出し DMTRP 遺伝子の配列決定に用いる鋳型とした。

#### 2-1-7. シーケンシング

Big Dye Terminator 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用いて、2-6 で精製したプラスミド DNA に対してサイクルシーケンス反応を行った。反応条件は、最初に 96°C で 1 分間熱変性を行った後、96°C で 10 秒の熱変性・50°C で 5 秒のアニーリング・60°C で 4 分のサイクルを 28 回繰り返し、最後に 60°C で 7 分間伸長反応を行った。その後精製を行い、ABI PRISM 3130X1 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) により塩基配列を決定した。得られた塩基配列は、Genetyx Ver.11 (Genetyx Corporation, Tokyo, Japan) を用いて解析を行った。



#### 2-1-8. アミノ酸配列の構造推定

シチヨウシンカイヒバリガイ DMTRP 遺伝子の全長配列を決定後、得られた配列を Genetyx Ver.11 によって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) を用いて NCBI (National Center for Biotechnology Information) が提供している BLAST プログラム (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 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、Phobius (Lukas *et al.* 2004, <http://phobius.sbc.su.se/>)を用いて解析を行った。また、各種生物 DMT と今回配列を決定した DMTRP、2-2 において取得した新規マガキ DMT 様配列をもとにアラインメントを行った。アラインメントは、MAFFT version 7 (Katoh and Standley 2013) を用いて行った。データベースから取得した各遺伝子のアクセッション番号はそれぞれ、ヒト DMT1 : AB004857、マガキ DMT : AB290410、ホタテ DMT : AB180910 である。

#### 2-2. 他の貝類における DMTRP 遺伝子の探索

OysterBase (<http://www.oysterdb.com/FrontHomeAction.do?method=home>) が提供している BLAST プログラム内の tblastn において、DMT および上記で得られた DMTRP 配列に対して相同性検索を行った。膜貫通部位の推定は、Phobius (Lukas *et al.* 2004, <http://phobius.sbc.su.se/>)を用いて解析を行った。

#### 2-3. DMT, DMTRP の分子系統解析

第 2 章で得られたシチヨウシンカイヒバリガイ DMTRP 遺伝子及び、第 5 章で得られたマガキの DMT 様遺伝子配列を含む、各種生物の DMT1 遺伝子配列及び、DMT1 と同じ SLC11 ファミリーに含まれる Nramp1 遺伝子を NCBI の gene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>) から取得した。得られた各種生物の DMT1 遺伝子配列及び Nramp1、DMTRP 配列は、MAFFT version 7 (Katoh and Standley, 2013) を用いてアラインメントし、trimAL v1.2 (Capella-Gutiérrez *et al.* 2009, <http://trimal.cgenomics.org/>) により、アラインメントが困難な領域を自動的に削除した。その後、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。外群には、酵母及び大腸菌の DMT1 遺伝子である MNT 及び SMF1 を用いた。

#### 2-4. DMT, DMTRP 遺伝子の組織発現特異性解析

##### 2-4-1. 生物試料

DMT 及び DMTRP 遺伝子両種の全長 cDNA が単離されているシチヨウシンカイヒバリガイ (*Bathymodiolus septemdierum*) を用いた。シチヨウシンカイヒバリガイは前述の 2-2-1.と同様に採集・冷凍保存されたものを用いた。解剖した組織は、閉殻筋・足糸牽引

筋・足（根本）・足（中部）・足（先端）・鰓・腸管（心臓）・腸管（閉殻筋）・腎臓・唇弁・外套膜（外側）・外套膜（真ん中）・外套膜（内側）・生殖腺・心臓の計 15 組織である。

#### 2-4-2. RNA 抽出と cDNA の合成

冷凍保存されていた各組織から total RNA を、TRIpure を用いて抽出した。Deoxyribonuclease I, Amplification Grade による DNase 処理後、455 ng の total RNA より、SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR に付属する SuperScriptIII RT を用いて二重鎖 cDNA プールを合成し、これを PCR の際のテンプレート cDNA とした。

#### 2-4-3. プライマーの設計

DMT 遺伝子の発現解析のために、DMT 特異的フォワードプライマー5'DMT 及びリバースプライマーsDMT を設計した(表 1)。また、DMTRP 遺伝子の発現解析のため、DMTRP 特異的フォワードプライマー5'DMTRP 及びリバースプライマーsDMTRP-R を設計した。

#### 2-4-4. 発現組織特異性解析

KOD -plus- (TOYOBO) DNA ポリメラーゼを用いて、添付のプロトコールに従い反応液を調製し、PCR 法による配列の増幅を行った。DMT 遺伝子の増幅には、5'DMT、sDMT プライマーを用い、DMTRP 遺伝子の増幅には 5'DMTRP と sDMTRP プライマー及び、TPG-F と TSS-R プライマーを用いた。また、PCR のポジティブコントロールとして、シチウシンカイヒバリガイ 18SrRNA 特異的プライマーである 18s-F 及び 18s-R プライマーによる配列の増幅をおこなった。反応条件は、DMT 遺伝子の増幅に関してはまず 94°C で 2 分間の熱変性を行ったあと、94°C で 15 秒の熱変性・62°C で 30 秒のアニーリング・68°C で 45 秒の伸長反応のセットを 30 サイクル行い、最後に 68°C で 7 分の伸長反応を行った。DMTRP 遺伝子の増幅に関して、5'DMTRP と sDMTRP プライマーの組み合わせでは、94°C で 2 分間の熱変性を行ったあと、94°C で 15 秒の熱変性・66°C で 30 秒のアニーリング・68°C で 45 秒の伸長反応のセットを 35 サイクル行い、最後に 68°C で 7 分の伸長反応を行った。TPG-F と TSS-R プライマーの組み合わせでは、94°C で 2 分間の熱変性を行ったあと、94°C で 15 秒の熱変性・61°C で 30 秒のアニーリング・68°C で 1 分 20 秒の伸長反応のセットを 30 サイクル行い、最後に 68°C で 7 分の伸長反応を行った。18SrRNA に関しては、94°C で 2 分間の熱変性を行ったあと、94°C で 15 秒の熱変性・58°C で 30 秒のアニーリング・68°C で 30 秒の伸長反応のセットを 25 サイクル行い、最後に 68°C で 7 分の伸長反応を行った。得られた PCR 産物は、1.5%アガロースゲルを用いた電気泳動により、増幅とサイズを確認した。

## 2-5. シチヨウシンカイヒバリガイの DMT 遺伝子の発現量解析

### 2-5-1. 生物試料

2-2-1.と同様に採集されたのち、1 か月間新江ノ島水族館において飼育されていたシチヨウシンカイヒバリガイを用いた。大きさは、殻長  $6.9 \pm 1.2$  cm, 殻高  $3.7 \pm 0.5$  cm, 殻幅  $2.7 \pm 0.5$  cm であった。

### 2-5-2. 重金属を含む溶液の作成

DMT 遺伝子の外環境の影響による発現応答を調べるため、重金属を含む溶液を作成した。曝露する金属として、ヒト DMT1 において輸送が確認されており (Gunshin *et al.* 1997)、シチヨウシンカイヒバリガイの生息する明神海丘堆積物中にある金属のうち、海水中で 2 価になり、他の背弧海盆・海嶺よりも多い金属として、銅・鉛・亜鉛 (飯笹ほか 1998) を、ヒト DMT1 において輸送が確認されていないが明神海丘堆積物中に含まれる水銀 (丸茂ほか 2013)、一般的な熱水噴出域堆積物中に含まれる鉄・カドミウム (飯笹ほか 1998) を選択した。各溶液の濃度は、二枚貝における各金属の LD<sub>50</sub> の値 (Yap *et al.* 2004, Devi 1996) 及び、二枚貝への重金属曝露実験を行った先行研究 (Muralidharan *et al.* 2011, Company *et al.* 2010, Yann *et al.* 2006) に倣い、LD<sub>50</sub> の値の低い銅・水銀に関しては  $50 \mu\text{g/L}$  に、それ以外に関しては  $100 \mu\text{g/L}$  になるように調製した。

### 2-5-3. 重金属曝露

シチヨウシンカイヒバリガイは、無脊椎動物の飼育の際に有害となる金属イオンを除去した人工海水 MARINE ART BR (大阪薬研株式会社、大阪、日本) 15 L 中で 24 時間の馴致の後、水銀・カドミウム・鉛・銅・鉄・亜鉛の各種金属を含む人工海水中及び、ネガティブコントロールとして、何の金属も添加しない人工海水中の計 7 群に、7 日間曝露した。それぞれの群に 5 個体から 8 個体使用した。

### 2-5-4. RNA 抽出と濃度調節

7 日間の曝露終了後、各個体は閉殻筋・足糸牽引筋・足・鰓・腸管・腎臓・唇弁・外套膜・生殖腺・心臓の計 10 組織をサンプリングし、使用まで  $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。各組織は TRIsure を用いて抽出した。抽出後、各サンプルの濃度を  $100 \text{ ng}/\mu\text{L}$  となるように調製した。

### 2-5-5. DNase 処理、cDNA 合成

濃度を調節し、Deoxyribonuclease I, Amplification Grade による DNase 処理後、20 ng の total RNA を、MultiScribe™ Reverse Transcriptase (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits に付属、Applied Biosystems) 逆転写酵素を用いて cDNA を合成した。

#### 2-5-6. プライマー、TaqMan プローブの設計

リアルタイム PCR のためのプライマー及びプローブは、シチヨウシンカイヒバリガイ DMT 遺伝子特異的となるように、GenScript が提供する Bioinformatics Tools の中の、GenScript Real-Time PCR (TaqMan) Primer Design を使用し、特異的フォワードプライマーDMT-F、リバースプライマーDMT-R 及びプローブ DMT-P を設計した。

#### 2-5-7. 定量的リアルタイム PCR

合成した cDNA を 1.5  $\mu$ L 用いて、20  $\mu$ L リアルタイムの反応系でリアルタイム PCR を行った。その際のスタンダードとして、シチヨウシンカイヒバリガイ DMT 全長 cDNA のプラスミドを、100 pmol, 10 pmol, 1 pmol, 0.1 pmol, 0.01 pmol, 0.001 pmol, 0.0001 pmol となるように調製した。反応条件は、50°C で 2 分、95°C で 10 分の熱変性を行った後、95°C で 15 秒の熱変性・60°C で 1 分の伸長反応のセットを 45 サイクル行った。

リアルタイム PCR を実施する組織は、まず重金属に曝露せず 7 日間飼育したコントロール群の各組織間について最初に解析を行い、最も発現量が多かった組織と、ヒトなど哺乳類において最も DMT が高発現となる十二指腸 (Gunshin *et al.* 1997) に対応する組織として腸管、ホタテガイにおける RT-PCR による DMT 組織発現特異性解析の結果、鰓、腸管に次いで高発現であった閉殻筋 (Toyohara *et al.* 2005)、貝殻形成を行う外套膜、足糸の作成を行う足についても解析を実施した。

#### 2-5-8. 統計解析

統計解析は、ANOVA による分散分析を行い、これにより有意差が検出されたものに関して、TukeyHSD 法によるパラメトリック多重比較を行った。

### 3. 結果

#### 3-1. シチヨウシンカイヒバリガイにおける cDNA の単離

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

哺乳類では、DMT1 遺伝子の発現が十二指腸で最も高発現である (Gunshin *et al.* 1997) ことから、はじめに腸管から cDNA ライブラリーを作成した。これを用いて次世代シーケンサーにより得られた DMTRP 遺伝子の配列断片により設計した特異的フォワードプライマーTPG-F 及びリバースプライマーTSS-R による PCR による DMTRP 遺伝子の増幅を試みたが、バンドの出現が確認できなかった。そこで、TPG-F 及び TSS-R を用いた予備的な RT-PCR による組織発現特異性解析を行ったところ (3-4 でより詳細な解析を行ったため、ここではデータ省略)、生殖腺において DMTRP 遺伝子が高発現であったことから、生殖腺から cDNA ライブラリーを作成した。その結果、TPR-F と TSS-R の組み合わせに

よって、生殖腺から DMTRP 様の部分配列を得ることに成功した。

部分配列を決定後、特異的なプライマーを設計し、上流側と下流側の配列を、5′および 3′-RACE により増幅した産物を鋳型に nested-PCR を行い単一バンドを取得することで、5′及び 3′末端の配列取得に成功した。

得られた全長配列には、長さの異なる 2 種類が存在した (図 3)。長い方の配列は 523 残基の ORF を含んでいた (図 4)。一方、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。後者をアミノ酸に翻訳すると、アミノ酸残基の早い段階で終止コドンが出現し、輸送体としての機能を果たしていないと考えられたため (図 5)、前者が DMTRPcDNA の正しい配列であると判断した。長い方にコードされるタンパク質を以下 DMTRP、短い方がコードするタンパク質を DMTRP-del と呼ぶ。なお、大腸菌クローン数で比較すると、DMTRP をインサートとして持つクローンよりも、DMTRP-del をインサートとして持つクローンのほうが圧倒的に多かった。

DMTRP の膜貫通部位の解析を行ったところ、膜貫通部位が 12 か所推定され、DMT と同様 12 回膜貫通型膜タンパク質であることがわかった (図 6)。また、同プログラムの二次構造予測図によると、C 末端及び N 末端は両者とも細胞内に突出することがわかった。

次に、DMTRP と DMT のアラインメント解析を行った (図 7)。両者の相同性は、50.29% であった。とくに相同性が高かった (相同なアミノ酸が 10 残基以上連続した) 部分は、第 1 膜貫通部位、第 6 膜貫通部位、第 8 膜貫通部位内に存在した。

NCBI の BLAST 検索では、シチヨウシンカイヒバリガイ DMT 遺伝子を質問配列にして検索しても、DMTRP 遺伝子を質問配列として検索しても、どちらも既知の DMT またはそのホモログと見られる hypothetical protein、そして natural resistance-associated macrophage protein 2-like (表 2、3) が、高い相同性を持つタンパク質として検出された。

### 3-2. 他の貝類における DMTRP 遺伝子の探索

カキゲノムデータベースにおいて Blast 検索を行った結果、2 つの遺伝子配列がヒットした。1 つはマガキ DMT1 遺伝子として GenBank に登録されている (アクセッション番号 AB290410.1) ものであったが、もう一つは未登録の新規配列であった。この新規配列は 544 残基の ORF を持ち、膜貫通部位の解析を行ったところ、膜貫通部位が 12 か所推定され、DMT と同じ膜貫通型タンパク質であることがわかった (図 9)。また、同プログラムの二次構造予測図によると、C 末端及び N 末端は両者とも細胞内に突出することがわかった。次にマガキの 2 つの DMT 様配列のアラインメント解析を行った (図 10)。両者の相同性は 52.66% であり、特に相同性が高い (相同なアミノ酸が 10 残基以上連続した) 部分は、第 1 膜貫通部位から第 1 細胞外領域にかけて、および第 8 膜貫通部位に存在した。

### 3-3. DMT、DMTRP の分子系統解析

NCBI の Nucleotide データベースにおける検索によって、すでに同定されている代表的な脊椎動物（ヒト、ヒラメ、ゼブラフィッシュ、ラット、アフリカツメガエル）及び無脊椎動物（イエバエ、ショウジョウバエ、線虫）に加え、本研究で得られたシチヨウシンカイヒバリガイの DMT 及び DMTRP、前項で検出された 2 つのマガキ DMT 様遺伝子 2 つ、DMT と同じ SLC11 グループに属するヒトの Nramp1 を用いて、分子系統解析を行った（図 11）。その結果、シチヨウシンカイヒバリガイ DMT、ホタテガイ DMT、マガキの未記載の DMT 様配列がクラスターを形成し、このクラスターは哺乳類 DMT1 等の既知の真核生物の DMT が形成するクレードに含まれた。一方、シチヨウシンカイヒバリガイ DMTRP と、マガキ DMT1 として登録されている配列とが独立したクレードを形成することがわかった。すなわち、マガキ DMT として登録されている配列はシチヨウシンカイヒバリガイ DMTRP と相同であり、新しく発見した DMT 様配列のほうがシチヨウシンカイヒバリガイやホタテガイの DMT および哺乳類 DMT1 と相同であることになる。

#### 3-4. シチヨウシンカイヒバリガイにおける DMT と DMTRP の発現組織特異性解析

DMT は 1 塩基目から 528 塩基目までの領域を増幅するように設計したプライマー 5'DMT×sDMT で RT-PCR を行った結果、足のどの部位でも発現量が高く、次いで外套膜（内側）・閉殻筋・鰓・唇弁・生殖腺となった。DMTRP は、1 塩基目から 522 塩基までの領域を増幅するように設計したプライマー、5'DMTRP×sDMTRP-R では、全組織で一律に増幅が確認された。そこで次に、118 塩基目から 1300 塩基目までを増幅するように設計したプライマー TPG-F×TSS-R では、DMT の結果と同様の傾向を示す結果が得られた。

#### 3-5. シチヨウシンカイヒバリガイの DMT 遺伝子の発現量解析

##### 3-5-1. 重金属曝露後の生残数

重金属曝露は、コントロールで 5 個体、水銀で 8 個体、残りの曝露群に 7 個体ずつで行った。この結果、曝露開始から終了までの生残数は、銅に曝露した群では全個体生残し、次いで鉄・亜鉛・コントロール群で 1 個体ずつ死亡し、水銀・カドミウム・鉛群で 2 匹ずつ死亡した（表 4）。

##### 3-5-2. リアルタイム PCR

重金属に曝露せず 7 日間飼育したコントロール群の各組織について最初に解析を行った（図 13）。TukeyHSD ( $P<0.05$ ) により有意差検定を行うと、表 5 の通り、いくつかの組織間で有意差が認められた（表 5）。各種金属に曝露後の、鰓（図 14）、腸管（図 15）、閉殻筋（図 16）、外套膜（図 17）および足（図 18）における mRNA 量を定量的リアルタイム PCR により定量した結果は、いずれの組織においても、コントロールと金属曝露群

の間に有意差は見られなかった。ただし、腸管においてカドミウム曝露群と亜鉛曝露群の間で、また、足において亜鉛曝露群とカドミウム・水銀・鉄曝露群との間でそれぞれ有意差が確認された。

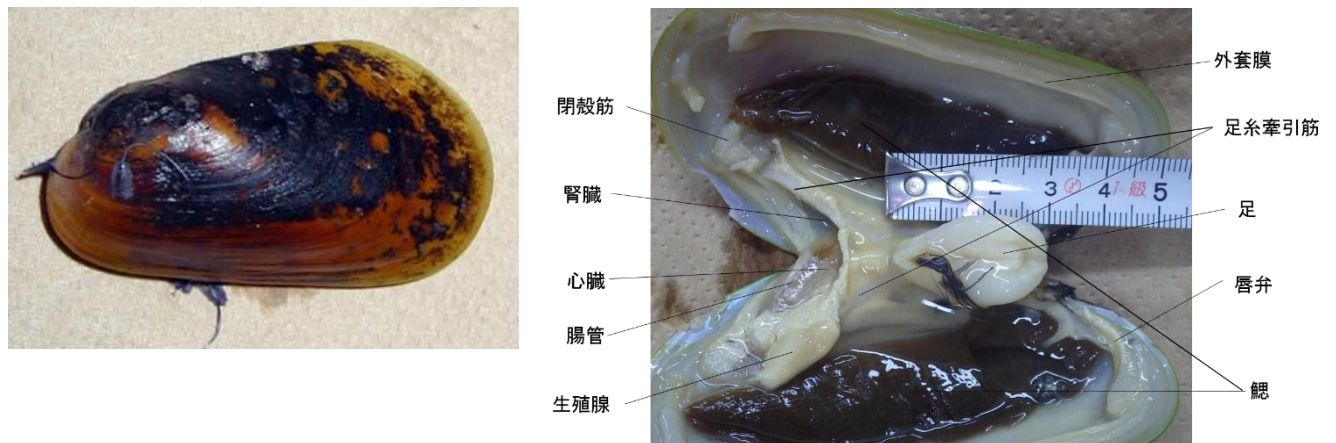


図 1. 試料として用いたシチヨウシンカイヒバリガイ (*Bathymodiolus septemdierum*) (左) およびその解剖図と実験で用いた組織 (右)。

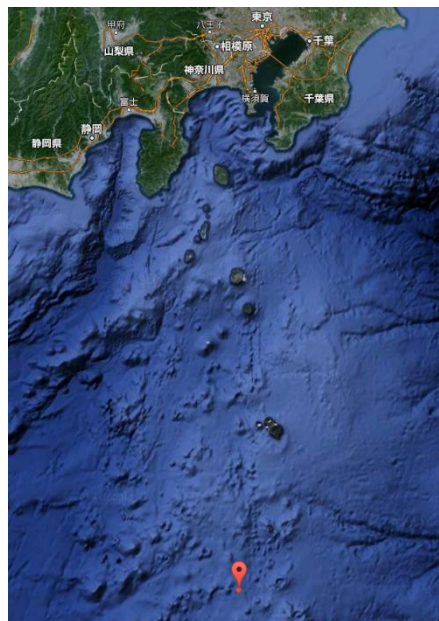


図 2. 本研究で用いたシチヨウシンカイヒバリガイの採集地である伊豆小笠原海域・明神海丘の位置。地図は Google Map (<https://maps.google.co.jp/>) より取得。



表 1. 使用したプライマー一覧。

プライマー名	配列	目的
TPG-F	ACCCAGGACAAGTTAAG GTTCCAAAAACA	シチヨウシンカイヒバリガイ (Bs) DMTRP 部分配列単離
TSS-R	CTCTCTCATAATTGTTTCAC TGCTGGT	BsDMTRP 部分配列単離
5' PCR	AAGCAGTGGTATCAACGC AGAGT	BsDMTRP5'-RACE
FSD-R	CTCTGTGTGCTGGATCTGA AAA	BsDMTRP5'-RACE
5' PCR-inner	AGTGGTATCAACGCAGAG TGGCATT	BsDMTRP5'-RACE (nested-PCR)
sDMTRP-R	CCTGCCCATATAGGTATCT TGTGATTGGA	BsDMTRP5'-RACE (nested-PCR)
FSD-F	TTTTCAGATCCAGCACACA GAG	BsDMTRP3'-RACE
NotIADPN1	AACTGGAAGAATTCGCGG CC	BsDMTRP3'-RACE
TSS-F	ACCAGCAGTGAAACAATT ATGAGAGAG	BsDMTRP3'-RACE (nested-PCR)
NotIADPN2	TTCGCGGCCGCAGGAA	BsDMTRP3'-RACE (nested-PCR)
T7	TAATACGACTCACTATAGG GCG	BsDMTRPコロニーダイレクトPCR
SP6	ATTTAGGTGACACTATAGA ATACTCAAG	BsDMTRPコロニーダイレクトPCR
5' DMT	ATGGCAGAACAGTTAGAT GGGATAGG	BsDMT 発現組織特異性解析
sDMT	AATCGTTATCAGTACACCA GCATATAACGG	BsDMT 発現組織特異性解析
5' DMTRP	ATGACGACAAGCGAAGAA TGCTCTCCTCTA	BsDMT 発現組織特異性解析
18s-F	TACCGTCGTAGTTCTGACC ATAAAC	Bs18SrRNA 発現組織特異性解析 (内部対照)
18s-R	GAATTAACCAGACAAATC GCTCCAC	Bs18SrRNA 発現組織特異性解析 (内部対照)
DMT-F	TGGCAGAACAGTTAGATG GG	BsDMT 定量的リアルタイムPCR
DMT-R	TGTGGATCTTCTGGAATG GA	BsDMT 定量的リアルタイムPCR
DMT-P	CCACGTTTGACCTCGGTG GC	BsDMT 定量的リアルタイムPCR
GAP-F	GTGGCGGAGGCGATCAA ATATAACAG	BsDMTRP 部分配列増幅
GAP-R	CTGTTATATTTGATCGCCTC CGCCAC	BsDMTRP 部分配列増幅

```

BsDMTRP-sassa 1: ATGACGACAAGCGAAGAATGCTCTCTCTAAATGAACAACCTGTAAATAATTATTTAAGT 60
BsDMTRP-del 1: ATGACGACAAGCGAAGAATGCTCTCTCTCTAAATGAACAACCTGTAAATAATTATTTAAGT 60
*****
BsDMTRP-sassa 61: GTTTTAGTACAAGGAACAGATAATGGTATAGTTGATGAAAAGAGAGGATTTGAAATTACC 120
BsDMTRP-del 61: GTTTTAGTACAAGGAACAGATAATGGTATAGTTGATGAAAAGAGAGGATTTGAAATTACC 120
*****
BsDMTRP-sassa 121: CCAGGACAAGTTAAGGTTCCAAAAACACATAATACATCATTGAGTTTATAGGAAGCTATGG 180
BsDMTRP-del 121: CCAGGACAAGTTAAGGTTCCAAAAACACATAATACATCATTGAGTTTATAGGAAGCTATGG 180
*****
BsDMTRP-sassa 181: GCGTTACGCGGTCCTGGTTTTCTGATGAGCATTGCTTACCTAGACCCAGGAAATATAGAA 240
BsDMTRP-del 181: GCGTTACGCGGTCCTGGTTTTCTGATGAGCATTGCTTACCTAGACCCAGGAAATATAGAA 240
*****
BsDMTRP-sassa 241: TCTGATCTTCAAGCTGGTGCAATAGCAAAGTACAAGTTAATATGGGTATTATGTGGTCA 300
BsDMTRP-del 241: TCTGATCTTCAAGCTGGTGCAATAGCAAAGTACAAGTTAATATGGGTATTATGTGGTCA 300
*****
BsDMTRP-sassa 301: ACAGTTTATAGGATTGATTCTACAACTACTAGCTGCCAGACTAGGATGTGTTACTGGTATG 360
BsDMTRP-del 301: ACAGTTTATAGGATTGATTCTACAACTACTAGCTGCCAGACTAGGATGTGTTACTGGTATG 360
*****
BsDMTRP-sassa 361: AATTTAGCACAAATTTGTCACCTTAGAGTACCCATTAGTACCCCGTGTCTGCTCTGGTTT 420
BsDMTRP-del 361: AATTTAGCACAAATTTGTCACCTTAGAGTACCCATTAGTACCCCGTGTCTGCTCTGGTTT 420
*****
BsDMTRP-sassa 421: ATGGTAGAGATAGCCATTGTAGGAAGTGATATACAGGAAGTCATAGGATCTGCTATAGCT 480
BsDMTRP-del 421: ATGGTAGAGATAGCCATTGTAGGAAGTGATATACAGGAAGTCATAGGATCTGCTATAGCT 480
*****
BsDMTRP-sassa 481: TTAAATCTTCTGTCCAATCACAGATACCTATATGGGCAGGTGTGTTGATTACTGGTGA 540
BsDMTRP-del 481: TTAAATCTTCTGTCCAATCACAGATACCTATATGGGCAGGTGTGTTGATTACTGGTGA 540
*****
BsDMTRP-sassa 541: GATACGTTTACCTTCTTATTCTGGAGAAATGCAGGGCTAAGAAAAC TAGAAGCCTTCTTT 600
BsDMTRP-del 541: GATACGTTTACCTTCTTATTCTGGAGAAATGCAGGGCTAAGAAAAC TAGAAGCCTTCTTT 600
*****
BsDMTRP-sassa 601: GGTGCTCTTATAGCATCCATGGCTGCAACGTTCTTCTATATTTATGTAACAATCAAACCA 660
BsDMTRP-del 601: GGTGCTCTTATAGCATCCATGGCTGCAACGTTCTTCTATATTTATGTAACAATCAAACCA 660
*****
BsDMTRP-sassa 661: AACCAAGGAGATATTCTGATTGGTATGTGGTTTCCATGGTGTGAGGATTGTGACAAGGAT 720
BsDMTRP-del 661: AACCAAGGAGATATTCTGATTGGTATGTGGTTTCCATGGTGTGAGGATTGTGACAAGGAT 720
*****
BsDMTRP-sassa 721: GCCGTTATACAGCTGGTAGGGATTGTAGGAGCAGTTATTATGCCACATAATATTTACCTA 780
BsDMTRP-del 721: GCCGTTATACAGCTGGTAGGGATTGTAGGAGCAGTTATTATGCCACATAATATTTACCTA 780
*****
BsDMTRP-sassa 781: CACAGTGCTTTAGTTTTGACAAGAAATATAGATAGAAAAGACAAACATGAAGTGGCGGAG 840
BsDMTRP-del 781: CACAGTGCTTTAGTTTTG----- 798
*****
BsDMTRP-sassa 841: GCGATCAAATATAACAGTATAGAAATCAGCCATAGCGTTATTTGTTTCCTTTCTTATCAAC 900
BsDMTRP-del 799: -----CCATAGCGTTATTTGTTTCCTTTCTTATCAAC 830
*****
BsDMTRP-sassa 901: CTGTTTGTGTTGGCTGTGTTTGTGTCAGAAATTTTCAGATCCAGCACACAGAGAATTAGCC 960
BsDMTRP-del 831: CTGTTTGTGTTGGCTGTGTTTGTGTCAGAAATTTTCAGATCCAGCACACAGAGAATTAGCC 890
*****
BsDMTRP-sassa 961: AGTCTACATAATGCTGGAATATGGCTAAGCGAAAAATATGGACTTGGTGTAATAATTATA 1020
BsDMTRP-del 891: AGTCTACATAATGCTGGAATATGGCTAAGCGAAAAATATGGACTTGGTGTAATAATTATA 950
*****
BsDMTRP-sassa 1021: TGGGGTATTGGAATATTATCTGAGGACAGAGTTCTACAATGACGGGAACATATGCAGGA 1080
BsDMTRP-del 951: TGGGGTATTGGAATATTATCTGAGGACAGAGTTCTACAATGACGGGAACATATGCAGGA 1010
*****
BsDMTRP-sassa 1081: CAATTTGTAATGGAGGGTTTTATGAATATCAAATGGGCTAAGTGGAAAAGAGTTTTATTG 1140
BsDMTRP-del 1011: CAATTTGTAATGGAGGGTTTTATGAATATCAAATGGGCTAAGTGGAAAAGAGTTTTATTG 1070
*****
BsDMTRP-sassa 1141: ACCAGATCCATCGCTATGGTACCAACAATAATACTAGCACTCCTAGCAACCAATGACCTT 1200
BsDMTRP-del 1071: ACCAGATCCATCGCTATGGTACCAACAATAATACTAGCACTCCTAGCAACCAATGACCTT 1130
*****
BsDMTRP-sassa 1201: GATATGATGAACAATTGTTGAATGTCCTTCAGAGTGTACAGCTACCCCTTTGCTCTTCTA 1260
BsDMTRP-del 1131: GATATGATGAACAATTGTTGAATGTCCTTCAGAGTGTACAGCTACCCCTTTGCTCTTCTA 1190
*****
BsDMTRP-sassa 1261: CCCATACTTCACTTCCACAGCAGTGAAACAATTATGAGAGAGTTTAAAAATGGAAGAATT 1320
BsDMTRP-del 1191: CCCATACTTCACTTCCACAGCAGTGAAACAATTATGAGAGAGTTTAAAAATGGAAGAATT 1250
*****
BsDMTRP-sassa 1321: ATGAAGATAACAGTATGGAGTTTAGCTGTCTTGATAATGGGAATCAACTTTTATCTAGTT 1380
BsDMTRP-del 1251: ATGAAGATAACAGTATGGAGTTTAGCTGTCTTGATAATGGGAATCAACTTTTATCTAGTT 1310
*****
BsDMTRP-sassa 1381: ATTATATTTGTGGGATCTGGAGATAAATGGTGGATTATCCGATAGTAGTGTAAATTATC 1440
BsDMTRP-del 1311: ATTATATTTGTGGGATCTGGAGATAAATGGTGGATTATCCGATAGTAGTGTAAATTATC 1370
*****
BsDMTRP-sassa 1441: GTTGTGTATCTGTCTGATGTAGCGTACCTGGCAATTGGTCCACACATGGTGTGAGACTG 1500
BsDMTRP-del 1371: GTTGTGTATCTGTCTGATGTAGCGTACCTGGCAATTGGTCCACACATGGTGTGAGACTG 1430
*****
BsDMTRP-sassa 1501: AAGGTGAGTTATCAGAAATAGTTTGAAGATACCAAAGGCGCTATCAGAAATCCGTAAATCGA 1560
BsDMTRP-del 1431: AAGGTGAGTTATCAGAAATAGTTTGAAGATACCAAAGGCGCTATCAGAAATCCGTAAATCGA 1490
*****
BsDMTRP-sassa 1561: AGGACAGAA 1569
BsDMTRP-del 1491: AGGACAGAA 1499
*****

```

図 3. シチヨウシンカイヒバリガイ DMTRP (BsDMTRP) と欠損部分を持つ配列 (BsDMTRP-del) のアラインメント結果。緑でラベリングした部分が、欠損部分。



```

1  GATGATATTCACGTTTTCTACTGAGTCATATTCAAAATCAATAGGGAAAATCTTGAAAATC      60
  D D I H V F T E S Y S K S I G K I L K I
61  TTGGTTGATCATAATAGTTCTATGTAAAGGTTGTTTGAAGTATTCTTGACAAAAAGGA      120
  L V D H N S S M * R L F E V F L D K K G
121  TTTTTCATAATTAATTATTTGATTTCTGCTGGCTGGTGATATTTAAAGCGATTATAATTAT      180
  F F T I N Y C I L L A G D I * S D Y N Y
181  GGAATGAGACTTTTTTTTATTTGCGTAGAATTTATCACCATGACGACAAGCGAAGAATGC      240
  G M R L F F Y C V E F I T M T T S E E C
241  TCTCCTCTAAATGAACAACCTGTAAATAATTATTTAAGTGTITTAGTACAAGGAACAGAT      300
  S P L N E Q P V N N Y L S V L V Q G T D
301  AATGGTATAGTTGATGAAAAGAGAGGATTGAAATTACCCAGGACAAGTTAAGGTTCCA      360
  N G I V D E K R G F E I T P G Q V K V P
361  AAAACACATAATACATCAITTCAGTTTTAGGAAGCTATGGGCGTTACGGGTCCTGGTTTT      420
  K T H N T S F S F R K L W A F T G P G F
421  CTGATGAGCATTGCTTACCTAGACCCAGGAAATATAGAATCTGATCTTCAAGCTGGTGCA      480
  L M S I A Y L D P G N I E S D L Q A G A
481  ATAGCAAGTACAAGTtAATATGGGTATtAATGTGgTCAaCAGTTTTAGGATTGATTCTA      540
  I A K Y K L I W V L M W S T V L G L I L
541  CAACTACTAGCTGCCAGACTAGGATGTGTACTGGTATGAATtAGCACAAATtGTCAC      600
  Q L L A A R L G C V T G M N L A Q I C H
601  TTAGAGTACCCATTAGTACCCcGTGTCGTCCTCTGGTTTATGGTAGAGATAGCCATTGTA      660
  L E Y P L V P R V V L W F M V E I A I V
661  GGAAGTGATATACAGGAAGTCATAGGATCTGCTATAGCTTTAAATCTTCTGTCCAATCAC      720
  G S D I Q E V I G S A I A L N L S N H
721  AAGATACCTATATGGGCAGGTGTGTGATTACTGGTGTAGATACGTTTACCTTCTTATTC      780
  K I P I W A G V L I T G V D T F T F L F
781  CTGGAGAATGCAGGGCTAAGAAAAGTGAAGCCTTCTTTGGTGCTCTTATAGCATCCATG      840
  L E N A G L R K L E A F F G A L I A S M
841  GCTGCAACGTTCTTCTATATTTATGTAAACAATCAAACCAACCAAGGAGATATTCTGATT      900
  A A T F F Y I Y V T I K P N Q G D I L I
901  GGTATGTGGTTTCCATGGTGTGAGGATTGTGACAAGGATGCCGTTATACAGCTGGTAGGG      960
  G M W F P W C Q D C D K D A V I Q L V G
961  ATTGTAGGAGCAGTTATTATGCCCACATAATTTTACCTACACAGTGCTTTAGTTTTGACA      1020
  I V G A V I M P H N I Y L H S A L V L T
1021  AGAAATATAGATAGAAAAGACAAACATGAAGTGGCGAGGCGATCAAATATAACAGTATA      1080
  R N I D R K D K H E V A E A I K Y N S I
1081  GAATCAGCCATAGCGTTATTTGTTTCTTTCTTATCAACCTGTTTGTGTGGCTGTGTTT      1140
  E S A I A L F V S F L I N L F V L A V F
1141  GCTGCAGAAATTTTCAGATCCGACACACAGAGAATTAGCCAGTCTACATAATGCTGGAATA      1200
  A A E F S D P A H R E L A S L H N A G I
1201  TGGCTAAGCGAAAAATATGGACTTGGTGTAAAAATTATATGGGGTATTGGAATATTATCT      1260
  W L S E K Y G L G V K I I W G I G I L S
1261  GCAGGACAGAGTTCTACAATGACGGGAACATATGCAGGACAATTTGTAATGGAGGGTTTT      1320
  A G Q S S T M T G T Y A G Q F V M E G F
1321  ATGAATATCAAAATGGGCTAAGTGGAAAAGAGTTTTATTGACCAGATCCATCGCTATGTA      1380
  M N I K W A K W K R V L L T R S I A M V
1381  CCAACAATAATACTAGCACTCCTAGCAACCAATGACCTTGATATGATGAACAATTGGTTG      1440
  P T I I L A L L A T N D L D M M N N W L
1441  AATGTCCTTCAGAGTGACAGTACCCCTTGTCTTCTACCCATACCTTCACTTCACCAGC      1500
  N V L Q S V Q L P F A L L P I L H F T S
1501  AGTGAACAATTATGAGAGAGTTTAAAAATGGAAGAATTATGAAGATAACAGTATGGAGT      1560
  S E T I M R E F K N G R I M K I T V W S
1561  TTAGCTGTCTTGATAATGGGAATCAACTTTTATCTAGTTATTATATTTGTGGGATCTGGA      1620
  L A V L I M G I N F Y L V I I F V G S G
1621  GATAAAATGGTGGATTATCCGATAGTAGTGTAAATTATCGTTGTGTATCTGTCTATGTA      1680
  D K W W I Y P I V V L I I V V Y L S Y V
1681  GCGTACCTGGCAATTGGTCCACACATGGTGTGAGACTGAAGGTGAGTTATCAGAATAGT      1740
  A Y L A I G P H M V L R L K V S Y Q N S
1741  TTGAAGATACCAAGGCGCTATCAGAATCCGTAATCGAAGGACAGAATAAAAAAGACAAC      1800
  L K I P K A L S E S V N R R T E * K D N
1801  AAGGACAAACAACATCTACAAAACATACATAAACTAAAGTGCTAGTGGCACACAAC      1860
  K D K Q Q S T K H T H K T K V L V A H N
1861  CTGGTATTGATTTTGAAGAAGACAGTGTCAAGTAACACAAATATTAAGGAAATGGTTCCA      1920
  L V L I L K K T V S S N T N I K E M V P
1921  TTCTACTTAATTATTTGATGTTGAGATTGATACTGGTTATATTTAATCACTGACGATAAC      1980
  F Y L I I * C * D * Y W L Y L I T D D N
1981  TCAAGTAAAAATGTTCAAGGTCTGTTGTTGTCATCATTAGAATCTGTTGCTGTAGTC      2040
  S S K M F Q G P V V V I T * N L L S V V
2041  CGTTGTCTGTAATCTGTTTACATTTTATCTGTCTCAGAGAAACCACTGAATCAAAGTGAA      2100
  R C L * S V H I L S V S Q K P L N Q S E
2101  TGAAGAAGAGTTTGAAGATACCAAGAAACCGTAAATCGAAGAAGGACGACACAACAAAT      2160
  * R R V * R Y Q R N R K S K K D G Q H N
2161  GACCAAAAAAAAAAAAAA      2179
  D Q K K K K

```

図 4. シチヨウシンカイヒバリガイ DMTRP の 5'-UTR から 3'-UTR までの全長配列。赤でラベリングした部分が開始メチオニン、青でラベリングした部分が終止コドン。



```

1  ATGACGACAAGCGAAGAATGCTCTCCTCTAAATGAACAACCTGTAAATAATTATTTAAGT    60
M  T T S E E C S P L N E Q P V N N Y L S
61  GTTTTAGTACAAGGAACAGATAATGGTATAGTTGATGAAAAGAGAGATTGAAATTACC    120
V L V Q G T D N G I V D E K R G F E I T
121 CCAGGACAAGTTAAGGTTCCAAAAACACATAATACATCATTAGTTTATAGGAAGCTATGG    180
P G Q V K V P K T H N T S F S F R K L W
181 GCGTTCACGGGTCCTGGTTTTCTGATGAGCATTGCTTACCTAGACCCAGGAAATATAGAA    240
A F T G P G F L M S I A Y L D P G N I E
241 TCTGATCTTCAAGCTGGTGCATAGCAAAGTACAAGTtAATATGGGTATtAATGTGtTCA    300
S D L Q A G A I A K Y K L I W V L M W S
301 aCAGTTTTAGGATTGATTCTACAACCTACTAGCTGCCAGACTAGGATGTGTTACTGGTATG    360
T V L G L I L Q L L A A R L G C V T G M
361 AATtTAGCACAAATtGTCACCTTAGAGTACCCATTAGTACCCcGTGTCGTCCTCTGGTTT    420
N L A Q I C H L E Y P L V P R V V L W F
421 ATGGTAGAGATAGCCATTGTAGGAAGTGATATACAGGAAGTCATAGGATCTGCTATAGCT    480
M V E I A I V G S D I Q E V I G S A I A
481 TTAATCTTCTGTCCAATCACAAGATACCTATATGGGCAGGTGTGTTGATTACTGGTGTA    540
L N L L S N H K I P I W A G V L I T G V
541 GATACGTTTACCTTCTTATTCCTGGAGATGCAGGGCTAAGAAAAGTAGAAGCCTTCTTT    600
D T F T F L F L E N A G L R K L E A F F
601 GGTGCTCTTATAGCATCCATGGCTGCAACGTTCTTCTATATTATGTAACAATCAAACCA    660
G A L I A S M A A T F F Y I Y V T I K P
661 AACCAAGGAGATATTCTGATTGGTATGTGGTTCCATGGTGTGAGGATTGTGACAAGGAT    720
N Q G D I L I G M W F P W C Q D C D K D
721 GCCGTTATACAGCTGGTAGGGATTGTAGGAGCAGTTATTATGCCACATAATATTACCTA    780
A V I Q L V G I V G A V I M P H N I Y L
781 CACAGTGCTTTAGTTTTGCCATAGCGTTATTTGTTTCCTTTCTTATCAACCTGTTTGTGT    840
H S A L V L P * R Y L F P F L S T C L C
841 TGGCTGTGTTTGTGCTGCAGAAATTTTCAGATCCAGACACAGAGAATTAGCCAGTCTACATA    900
W L C L L Q N F Q I Q H T E N * P V Y I
901 ATGCTGGAATATGGCTAAGCGAATAATATGGACTTGGTGTAAAAATTATATGGGGTATTG    960
M L E Y G * A K N M D L V * K L Y G V L
961 GAATATTATCTGCAGGACAGAGTTCTACAATGACGGGAACATATGCAGGACAATTTGTAA    1020
E Y Y L Q D R V L Q * R E H M Q D N L *
1021 TGGAGGGTTTTATGAATATCAATGGGCTAAGTGGAAAAGAGTTTTATGACCAGATCCA    1080
W R V L * I S N G L S G K E F Y * P D P
1081 TCGCTATGGTACCAACAATAATACTAGCACTCCTAGCAACCAATGACCTTGATATGATGA    1140
S L W Y Q Q * Y * H S * Q P M T L I * *
1141 ACAATTGGTTGAATGTCTTCAGAGTGACAGCTACCCTTTGCTCTTCTACCCATACCTC    1200
T I G * M S F R V Y S Y P L L F Y P Y F
1201 ACTTCACCAGCAGTGAAACAATTATGAGAGAGTTTAAAAATGGAAGAATTATGAAGATAA    1260
T S P A V K Q L * E S L K M E E L * R *
1261 CAGTATGGAGTTTAGCTGTCTTGATAATGGGAATCAACTTTTATCTAGTTATTATATTG    1320
Q Y G V * L S * * W E S T F I * L L Y L
1321 TGGGATCTGGAGATAAATGGTGGATTATCCGATAGTAGTGTAAATTATCGTTGTGTATC    1380
W D L E I N G G F I R * * C * L S L C I
1381 TGTCGTATGTAGCGTACCTGGCAATTGGTCCACACATGGTGTGAGACTGAAGGTGAGTT    1440
C R M * R T W Q L V H T W C * D * R * V
1441 ATCAGAATAGTTTGAAGATACCAAAGGCGCTATCAGAATCCGTAAATCGAAGGACAGAA    1499
I R I V * R Y Q R R Y Q N P * I E G Q

```

図 5. DMTRP-del をアミノ酸に翻訳した結果。赤い矢印の部分に欠損部分がある。青でラベリングした部分が終止コドン。

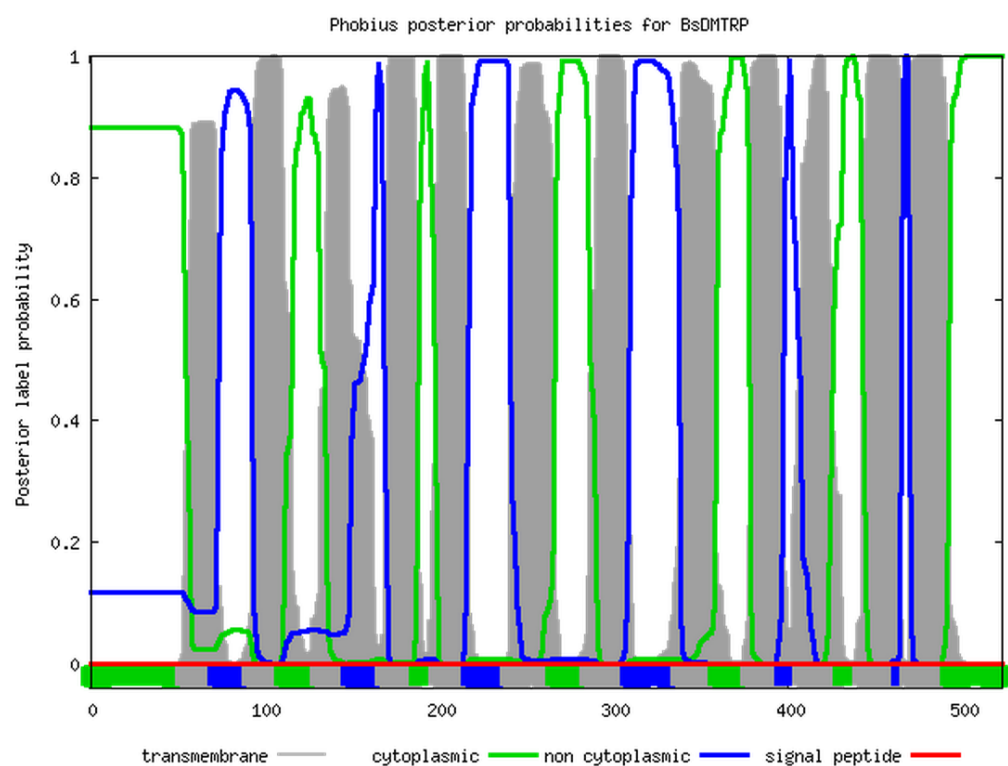


図 6. BsDMTRP 膜貫通部位予測。灰色が膜貫通部位、緑が細胞内領域、青が細胞外領域。

BsDMT	M--AEQLDGIGKEIVDSPNEE--VSKEKTPRLTSVASTYFDQK-----ISIPEDPQ
BsDMTRP	MTTSEEC-----SPLNEQPVNNYLSVLVQGTDNQIVDEKRGFEITPGQVKVPKTHN
	* :*: ** *: *: : : . . . . *: * : : *: :
BsDMT	KFFSFRKLWFTGPGFLMSIAYLDPGNIESDLQAGSVAKFRLLWVLMSTFLGLLMQRLA
BsDMTRP	TFSFRKLWFTGPGFLMSIAYLDPGNIESDLQAGAIKYKLIWVLMWSTVLGLILQLLA
	. *****: *: *: *: *: *: *: *: *
BsDMT	ARLGVTGMHLAEICYKHYSKVPRIILWIMIEIAIIGSDMQEVI GTAIAFYLLSDGKIPL
BsDMTRP	ARLGCVTGMNLAQICHLEYPLVPRVVLWFMVEIAIVGSDIQEVI GSAIALNLLSNHKIPI
	**** *: *: *: *: . *. *: *: *: *: *: *: *: *: *: *
BsDMT	YAGVLITITDTFTFLFLDKFGLRKLEFFFTFLIMVMAGTFGYEYIVVHPDQPSVLKGLFV
BsDMTRP	WAGVLITGVDFTFTFLFLENAGLRKLEAFFGALIASMAATFFYIYVTIKPNQGDILIGMWF
	: ***** . *****: ***** ** ** ** ** ** ** ** ** ** *: *: *: *: *
BsDMT	PGCEGCGPKQFLQAVGIIGAIIIMPHNIYLSALVKSARNVDRTKKEEVKEANKYFFIEATL
BsDMTRP	PWCQDCDKDAVIQLVGIVGAVIMPHNIYLSALVLRNIDRKDKHEVAEAIKYNIESAI
	* *: *. . . *: *****: *****: ***** . *: *. . *. ** ** ** *
BsDMT	ALIVSLIINIFVTSIFAEGFYGKTASQIHDKCVAEGNPHADLFNNVTDLSVDIYRGGVFL
BsDMTRP	ALFVSFLINLFVLAVFAAEFSDPAHREL-----ASLHNAGIWL
	* *: *: *: *: *: *: * . : : : . . . . *: *
BsDMT	GCQFGIAAMYIWA VGIL AAGQSSTMTGTYTGQFVMEGFLNLKWKRWQRVLLTRTIAIAPT
BsDMTRP	SEKYGLGVKIIWGIGILSAGQSSTMTGTYAGQFVMEGFMNIKWAKWKRVLLTRSIAMVPT
	. : *: . . ** . *****: *****: *****: *****: *****: *****
BsDMT	ILISIFEGIGQLSGMNDLLNVLSLQLPFALIPILAFTSSPHIMGDFKNGI VMKIIAGIL
BsDMTRP	IILALL-ATNDLDMNNWLNVLQSVQLPFALLPILHFTSSETIMREFKNGRIMKITVWSL
	* : : : : . . *: ** *: *****: ***** ***** ** *****: ***** *
BsDMT	TAVVIGINMYFVVYIQLPNHWAIYLAIIIVLLLFYFIFLLYLW--HCLVTMEIQIFSR
BsDMTRP	AVLIMGINFYLVIIIFVGS-GDKWWIYPIVVLIIVVYLSYVAYLAIGPHMVLRLKVSQNS
	: : : *: *: *: : . : *: ** : : : : *: : : *: * : : : . .
BsDMT	IPVSRFLYFMI---LI
BsDMTRP	LKIPKALSES VNR RTE
	: : : * :

図 7. シチヨウシンカイヒバリガイ DMT (BsDMT) と DMTRP (BsDMTRP) のアミノ酸配列のアラインメント結果。

表 2. シチヨウシンカイヒバリガイ DMTRP を質問配列にして Blast 検索をかけた結果検出された配列のうち、相同性の高かった配列上位 5 つ。

Species	Gene	Identity (%)	Score	E-value
カサガイの一種 ( <i>Lottia gigantea</i> )	hypothetical protein	79	616	0.0
マガキ ( <i>Crassostrea gigas</i> )	DMT	75	730	0.0
ナメクジウオの一種 ( <i>Branchiostoma floridae</i> )	hypothetical protein	75	606	0.0
アメリカムラサキウニ ( <i>Strongylocentrotus purpuratus</i> )	natural resistance-associated macrophage protein 2-like *	66	539	0.0
サザンプラティフィッシュ ( <i>Xiphophorus maculatus</i> )	natural resistance-associated macrophage protein 2-like *	60	497	7e-167

\*は予測配列

表 3. シチヨウシンカイヒバリガイ DMT を質問配列にして Blast 検索をかけた結果検出された配列のうち、相同性の高かった配列上位 5 つ。

Species	Gene	Identity (%)	Score	E-value
カサガイの一種 ( <i>Lottia gigantea</i> )	hypothetical protein	74	686	0.0
ジャンボアメフラシ ( <i>Aplysia californica</i> )	natural resistance-associated macrophage protein 2-like *	70	699	0.0
ホタテガイ ( <i>Mizuhopecten yessoensis</i> )	dmt	67	654	0.0
ナメクジウオの一種 ( <i>Branchiostoma floridae</i> )	hypothetical protein	68	609	0.0
コワレフスキーギボシムシ ( <i>Saccoglossus kowalevskii</i> )	natural resistance-associated macrophage protein 2-like *	69	607	0.0

\*は予測配列



BsDMTRP	M-----TTSEEC-----SPLNEQPVNNYLSVLVQGTNGIVDEKRGFEI
Toyster	M-----NKYATLDEDVADVAGDEHSIQKEGGRGFEI
scallop	M-----TT-SVNSEKKSVNETTASTYFDE-----
Noyster	M-----EDRTGSGD-GE-----GEGSAPKEN-OPIKASSASSTSIASTYFNN-----
BsDMT	M-----AEQL-DGI-GK-----EIVDSPPNE-EVSKEKTPRLTSVASTYFDQ-----
human	MVLGPQKMSDDSVSGDHGESASLGNINPAYSN-PSLSQSPGDSEEFATYFNE-----
	* I
BsDMTRP	TPGQVKVPKT-HNTSFSFRKLWFTGPGFLMSIAYLDPGNIESDLOAGAIAKYKLIVVLM
Toyster	AAGQVRIPKS-TGTAFSFRKLWAYTGPGLMSIAYLDPGNIESDLOAGAIAKYKLIVVLM
scallop	---RVAVPPP-DGTRFSFRKLWFTGPGFLMSIAYLDPGNVESDLRAGASQFKLLWVLM
Noyster	---KIP1PEDVQHPVFSRLKLAFTGPGFLMSIAYLDPGNIESDLRSGSAQFKLLWVLM
BsDMT	---KIS1PED-PQKFFSFRKLWFTGPGFLMSIAYLDPGNIESDLRAGSAQFKLLWVLM
human	---KIS1PEE-EYSCFSFRKLWFTGPGFLMSIAYLDPGNIESDLRSGAVAGFKLLWILL
	II III
BsDMTRP	WSTVLGLILQLLAARLGCVTGMNLAQICHLEYPLVPRVVLWFMVEIAIVGSDIQEVI GSA
Toyster	WSTVLGLILQLLAARLGCVTGMNLAECRLEYPRVPRYILWIMIEIAIIGSDIQEVI GSA
scallop	ISTVLGLLMQRLAARLGVVTGLHAEICFKRYPKVPRIILWVMVEIAIIGSDIQEVI GSA
Noyster	SATFLGLLMQRLAARLGVVTGMHAEVCYRSYPRIPRIALWIMVEIAIIGSDMOEVI GSA
BsDMT	SATFLGLLMQRLAARLGVVTGMHAEICYKHYSKVPRIILWIMIEIAIIGSDMOEVI GSA
human	LATLVGLLLQRLAARLGVVTGLHAEVCHROYKVPRIILWLMVELAIIIGSDMOEVI GSA
	IV V
BsDMTRP	IALNLLSNHKIPIWAGVLTITGDTFTFLFLENAGLRKLEAFFGALIASMAATFFIYVTI
Toyster	IALNLLSNKLPWAGVLTITGDTFTFLFLEQGLRKLAEFFCTLIIMAGAFYIYIKI
scallop	IAISILSNGKIPLYGGVLTITITDFTFLLLDRYGLRKLAEFFCTLIIMVMSIFGYEYVVV
Noyster	IAFYLLSDGKIPLYAGVLTITITDFTFLLLDKYGLRKLAEFFAVLILIMVVTFGYEVIV
BsDMT	IAFYLLSDGKIPLYAGVLTITITDFTFLFLDKYGLRKLAEFFCTLIIMVMTFGYEVIV
human	IALNLLSVGRIPWAGVLTITITDFTFLFLDKYGLRKLAEFFCTLIIMALTFGYEVIV
	VI
BsDMTRP	KPNQGDILIGMFWPCDCDKDAVILQVIGVGAIVMHNILYLSALVLRNIDRKDKKEV
Toyster	KPNQGDILIGLFWPCDCDKDAVILQVIGVGAIVMHNILYLSLVLVSRIDRKDKKEV
scallop	HPNQPVMMKGMFFPYCENGSDLELQIGVGAIVMHNILYLSALVKSROVNRKQKAAV
Noyster	SPDQPSLLRGMFVPCYCEGQPEQILQAVAIIGAIIMHNILYLSALVKSROIDRTKKDQV
BsDMT	HPDQPSVLKGLFVPGCEGCPKQFLQAVGIIIGAIIMHNILYLSALVKSROVNRKQKEV
human	KPSQSQVLKGMFVPCSGCGRTPQIEQAVGIVGAIVMHNILYLSALVKSROVNRNKKQEV
	VII
BsDMTRP	AEAISKYNSIESAIALFVSFLINLVLAFAAFSDPAHREL-----
Toyster	QESIMYNSIESAIALFVSFLINLVFVSFAAFSDPFYADO-----
scallop	SEANLYFFIESAIALFVSFLINLVFVTAIAEGFYGRSSQEIYHICTNASSPYADLFNMSH
Noyster	QEAKEYFFIESAIALFVSFLINLVFVTAIAEGFYGRVQVTOVT-----
BsDMT	KEANKYFFIESATLALIVSLIINIVFVTSIAEGFYGTASQIHDKCAEAGNPHADLFNVV-
human	REANKYFFIESCIALFVSFLINLVFVSFAEAFGKTNEQVVEVCTNTSSPHAGLFPKDN
	VIII
BsDMTRP	---ASLHNAGIWLSEKYGLGVKIIWGIIGILSAGOSSTMTGTYSQGFVMEGFNNIKWAKW
Toyster	---ASLRIAGNWLSENYGLAMKIVWGVGILAAAGOSSTMTGTYSQGFVMEGFQIKWAKW
scallop	VVADVDIYRGGIYLGCKYGI AAMYI WAGVILAAAGOSSTMTGTYSQGFVMEGFNLKWKRW
Noyster	TKLEVDIYFRGGVFLGCOFGLAAMYI WAGVILAAAGOSSTMTGTYSQGFVMEGFNLKWKRW
BsDMT	TDLSDVIYRGGVFLGCOFGIAAMYI WAGVILAAAGOSSTMTGTYSQGFVMEGFNLKWKRW
human	STLAVDIYKGGVFLGCFYGAALYI WAGVILAAAGOSSTMTGTYSQGFVMEGFNLKWSRF
	IX X
BsDMTRP	KRVLLTRSIAMVPTIILALL-ATNDLDMNNWNLNLSVOLPFALLPILHFTSSETIMRE
Toyster	KRVLLTRSIAMVPTIITVALA-ATNDLDMNNWNLNLSVOLPFALLPILHFTSNERIMKE
scallop	QRVLTRSIPIIPTVFPIYKIGDLTMDNLLNVLMSLQLPFALPIILFTNSEKLMGD
Noyster	VRVLTRSIPIIPTFVATFSGIDLTVMNMLNVLMSLQLPFALPIILFTTSSETIMGD
BsDMT	QRVLTRTIAIAPTILISIFEGIGLSGMNLLNVLMSLQLPFALPIILAFSSPHIMGD
human	ARVVLTRSIPIIPTLLVAVFDVEHLTGMNDFNLVLSLQLPFALPIILFTSLRPVMSD
	XI XII
BsDMTRP	FKNGRIMKIIWVSLAVLIMGTFYLVIIIVFGSG-DKWWIYPIVVLIIIVVLSYVAYLATG
Toyster	FKNGRAMKLAVLILAVLVMIINFFLYIVFVGTG-QAWYIYLVTTVVLIIYSMFVAYIALG
scallop	FKNGLFTKILTSVLVVVIVINLYFVAVYIPVLPHHWANLYFIALILTFYVLTAYLTWY
Noyster	FKNGRFMTIFTSLLVAVVIGINLFFISVYVHSLPHHWANLYLVSVLVMYIMFVILCLS
BsDMT	FKNGIVMKIIAGILTAIVVIGINMYFVVYIQLPNHWAIYLAIIVLLLFYIFLLYLVNH
human	FANGLGWRIAGGILVLIICSINMYFVVYVRDL-GHVALYVVAVSVAYLGFVYFLGWQ
	PHMVLRLKVSYN---SLKIP---KA-----LSESVNRRT---
BsDMTRP	PGTVLTVK-KYLS-----EKFGWS---QD-----EITNEIARRSSLYQP
Toyster	CLIGMGW---QWLL---KIPCP---QFLOYS---DDF---SIEVLEEEEEEIR---
scallop	CLKPRET---PYVL---SESISGTSDFQADA---TDFGSTSETRPVGEEGEE---
Noyster	CLVTMEI---QIFS---RIPVS-----RFLYFMIL---
BsDMT	CLTALGM---SFLDCGHTVTS---KG-----LLTEEATRGY---
human	
BsDMTRP	-----E
Toyster	ENIHAI
scallop	-----VD
Noyster	-----F
BsDMT	-----
human	-----VK

図 8. シチヨウシンカイヒバリガイ DMTRP (BsDMTRP)、マガキ DMT (Toyster)、ホタテガイ DMT (scallop)、マガキ新規取得 DMT 様 (Noyster)、シチヨウシンカイヒバリガイ DMT (BsDMT)、ヒト DMT1 (human) のアラインメント結果。\*は同一のアミノ酸を示す。水色が膜貫通部位、ピンクが Consensus Transport Motif を示し、赤で N-糖鎖付加部位を、シチヨウシンカイヒバリガイにおいて、G-77・D-82・Q-84 を紫、G-174 を黄、F-185 を緑、D-75・D-181・E-288 を茶、H-256・H-261 を青、E-365 を白で示した。



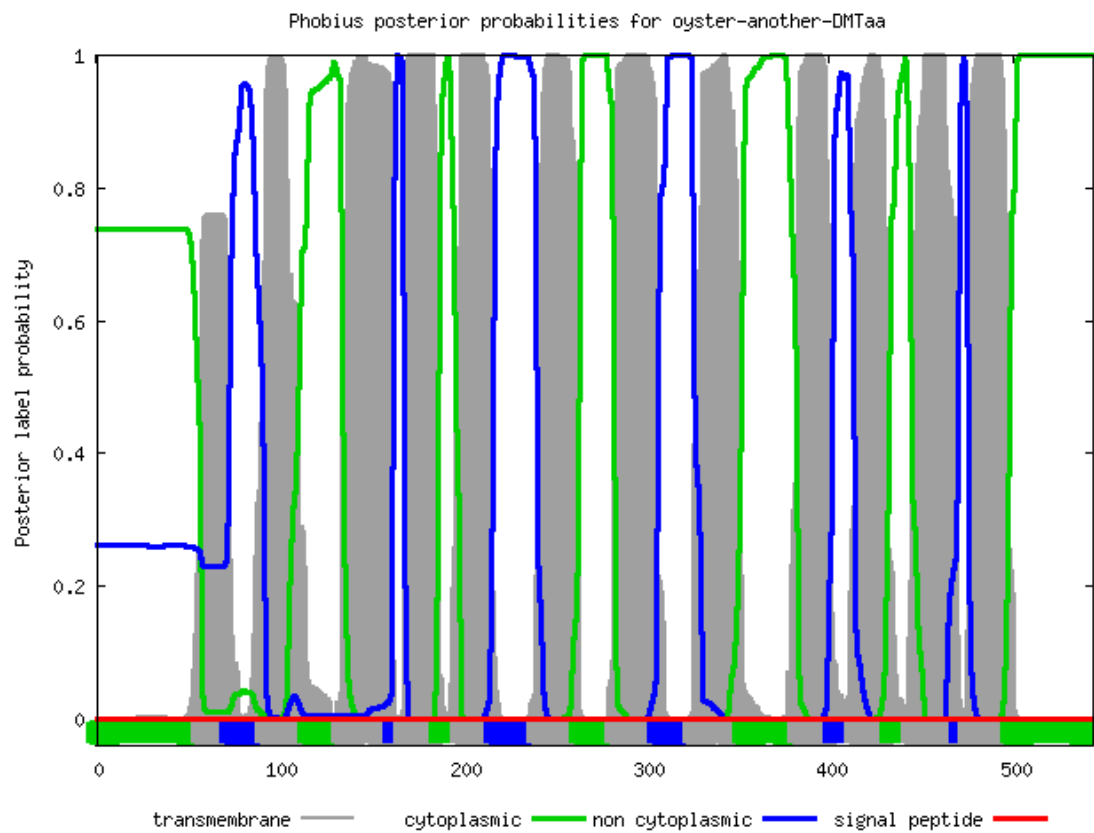


図 9. 新規マガキ DMT 様配列の膜貫通部位予測。



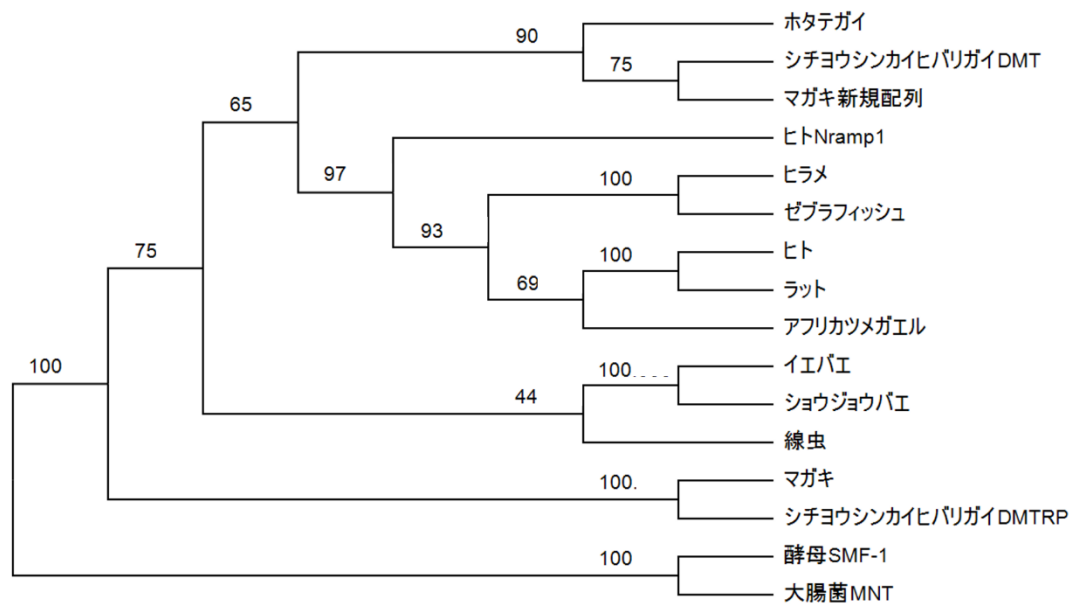


図 11. DMT 及び DMTRP の分子系統解析の結果。外群に酵母 SMF-1、大腸菌 MNT を用いた。

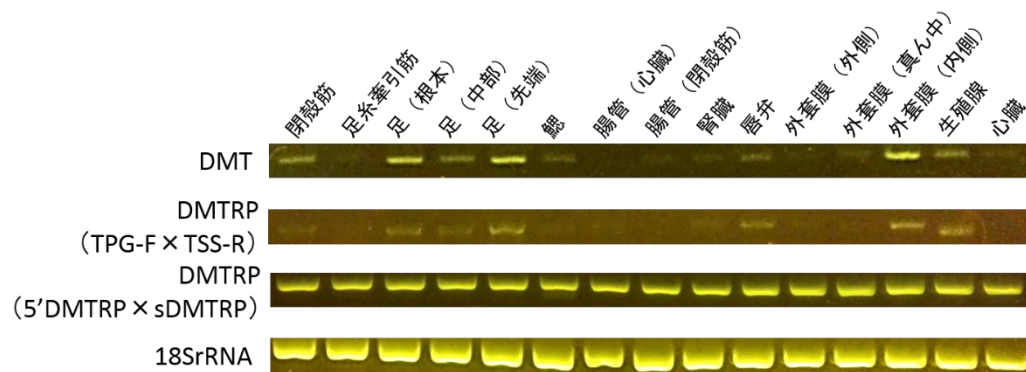


図 12. 組織発現特異性の結果。

表 4. 重金属曝露によるシチヨウシンカイヒバリガいの 7 日後生残数。

Ctrl がコントロール、Hg は水銀、Cd はカドミウム、Pb は鉛、Cu は銅、Fe は鉄、Zn が亜鉛に曝露した結果である。

	Ctrl	Hg	Cd	Pb	Cu	Fe	Zn
生残数/ 実験開始時数	4/5	6/8	5/7	5/7	7/7	6/7	6/7

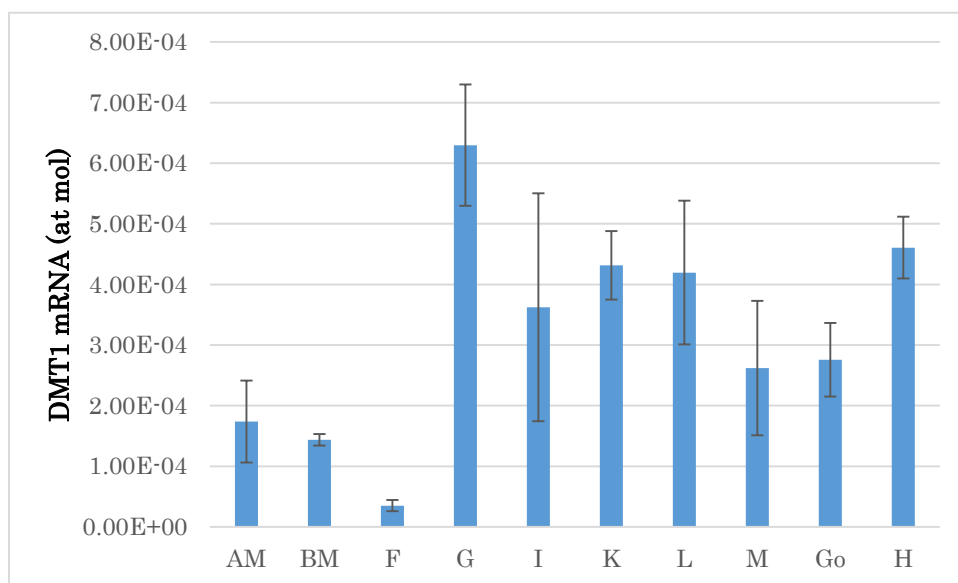


図 13. コントロール全組織におけるリアルタイム PCR の結果。n=3-4。AM が閉殻筋、BM が足糸牽引筋、F が足、G が鰓、I が腸管、K が腎臓、L が唇弁、M が外套膜、Go が生殖腺、H が心臓を示す。平均値±標準誤差で示す。

表 5. コントロール全組織におけるリアルタイム PCR の結果を TukeyHSD (\* $p<0.05$ )で解析を行った結果。○が有意差があったところ。

	AM	BM	F	G	I	K	L	M	Go	H
AM				○						
BM				○						
F				○		○	○			○
G	○	○	○						○	
I										
K			○							
L			○							
M										
Go				○						
H			○							

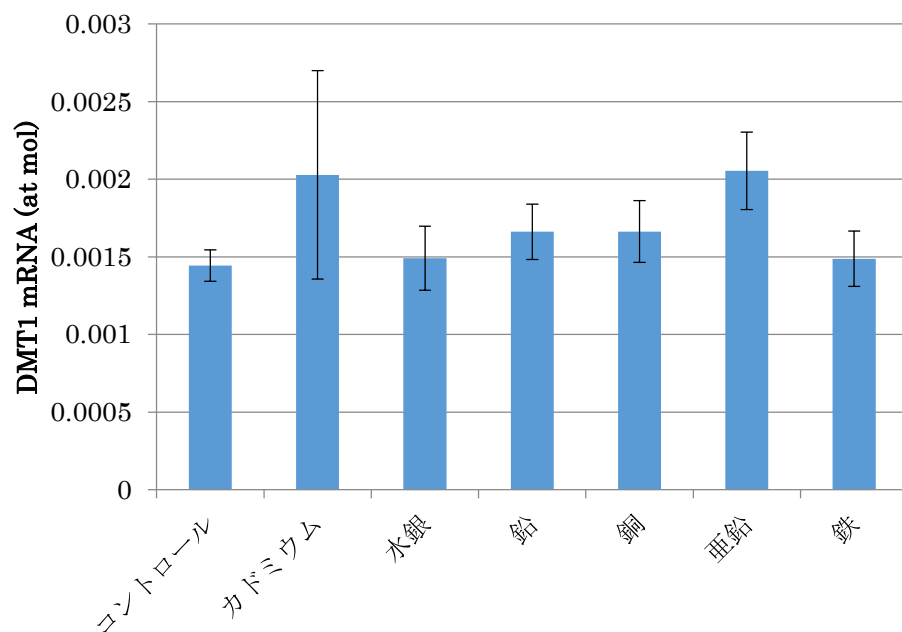


図 14. 各種金属に曝露後の鰓のリアルタイム PCR の結果。平均値±標準誤差で示す。  
n=3-7。ANOVA では各群間に有意差は認められない(\* $p<0.05$ )。

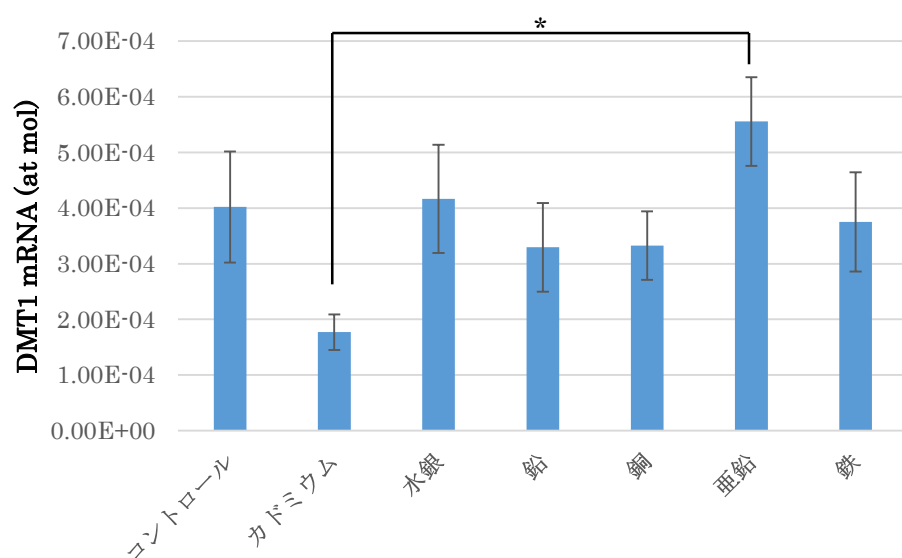


図 15. 各種金属に曝露後の腸のリアルタイム PCR の結果。平均値±標準誤差で示す。  
n=3-7。平均値±標準誤差で示す。カドミウム曝露群と亜鉛曝露群間の差は ANOVA およ  
び TukeyHSD により有意 (\* $p<0.05$ )。

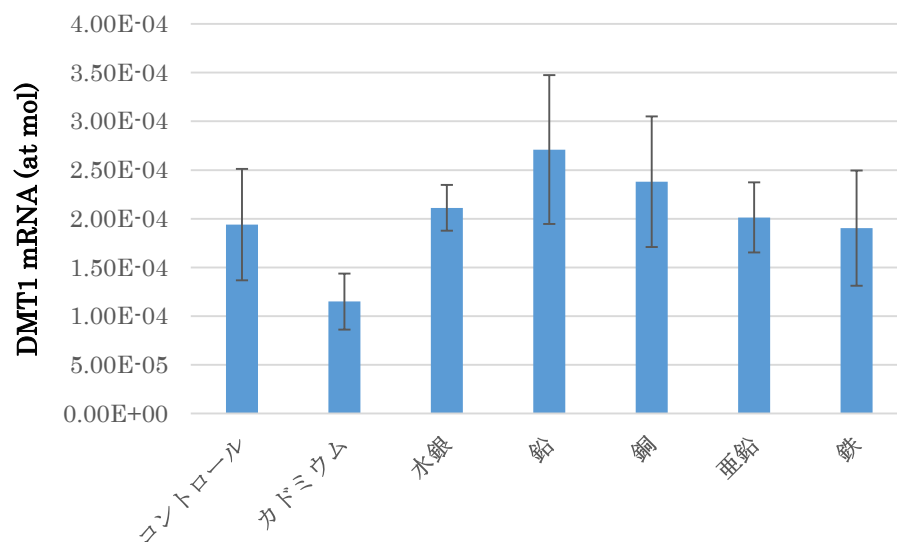


図 16. 各種金属に曝露後の閉殻筋のリアルタイム PCR の結果。平均値±標準誤差で示す。  
n=3-7。ANOVA では各群間に有意差は認められない(\* $p<0.05$ )。

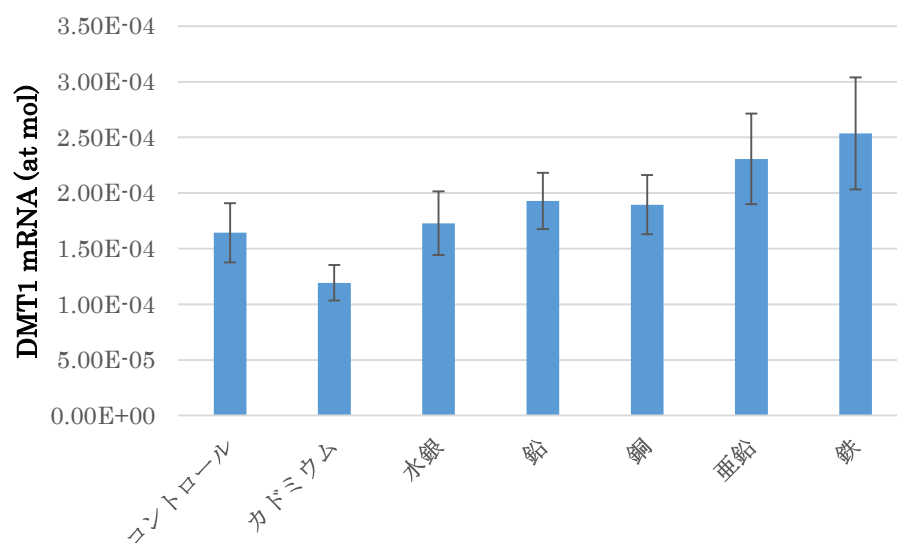


図 17. 各種金属に曝露後の外套膜のリアルタイム PCR の結果。平均値±標準誤差で示す。  
n=3-7。ANOVA では各群間に有意差は認められない(\* $p<0.05$ )。



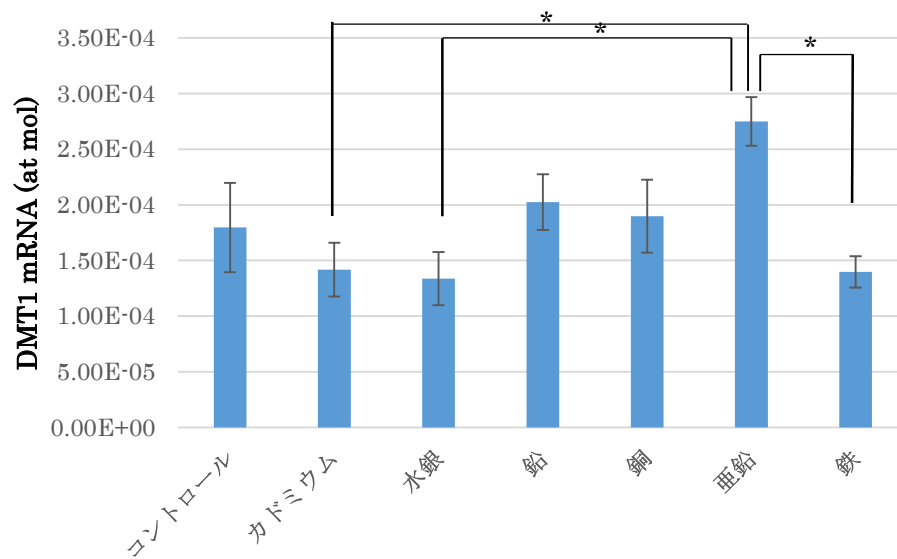


図 18. 各種金属に曝露後の足のリアルタイム PCR の結果。平均値±標準誤差で示す。  
 n=3-7。平均値±標準誤差で示す。カドミウム曝露群と水銀・亜鉛・鉄曝露群間の差は  
 ANOVA および TukeyHSD により有意 (P<0.05)。

#### 4. 考察

##### 4-1. シチヨウシンカイヒバリガイにおける DMTRP の cDNA 単離

###### 4-1-1. cDNA クローニング

本実験において、既知の DMT とは異なる DMTRP をコードする cDNA の配列の全長配列の取得に成功した。長短 2 種の cDNA 配列が単離され、長い方の配列は 523 残基の ORF を持ち、コードされるタンパク質は既知の DMT と相同性のある 12 回膜貫通型輸送体であることがわかったため、DMTRP と命名した。短い方 (DMTRP-del) は、長い方の配列に対して 70 塩基の欠損を持ち、欠損部位のすぐ下流で終止コドンが現れるため、スプライシングバリエーションであるか、PCR 酵素のエラーにより生じたアーティファクトである可能性が考えられた。大腸菌のクローン数で比較すると、DMTRP-del の方が圧倒的に多く得られたため、DMTRP-del も高発現していて、何らかの調節に関与している可能性がある。しかし、より短い配列であるために PCR において増幅されやすく、ベクターにも挿入されやすいことにより、優先的に検出されているだけである可能性もある。なお、5'-RACE、部分配列、3'-RACE の 3 つの配列を合成することで DMTRP の全長 cDNA としたが、これは、5'-UTR と 3'-UTR に設計したプライマーによる大腸菌クロンの作成を試みた結果、欠失配列を持つ配列ばかりが得られたためである。しかし、欠失部分に作成したプライマー、GAP-F と GAP-R と 5'-UTR と 3'-UTR 間で増幅断片が得られるため、長い DMTRP mRNA も発現していることは確実である。

###### 4-1-2. アミノ酸配列の構造解析

取得した 534 残基の ORF を含む配列 (DMTRP) は、シチヨウシンカイヒバリガイ DMT 配列に対してアラインメントした結果、一部に配列が欠失していることがわかった (図 7)。同様に、シチヨウシンカイヒバリガイ DMT および DMTRP、マガキ DMT (シチヨウシンカイヒバリガイ DMTRP に相当) 及び新規に取得したマガキ DMT 様配列 (シチヨウシンカイヒバリガイ DMT に相当)、ホタテガイ DMT、ヒト DMTRP とアラインメントした結果、同様の位置に同じ長さの欠失が、2 つのマガキ DMT 様配列にもあることがわかった (図 8)。欠失のある領域は、第 7 膜貫通部位と第 8 膜貫通部位の間の、細胞外領域である。DMT と DMTRP の機能の違いがあるとすれば、この欠失部分に関与している可能性がある。しかし、ヒト DMT1 ではこの部分に N-糖鎖付加部位が 2 つあることが報告されている (Gunshin *et al.* 1997) が、この部分に大きな欠失がある DMTRP と 2 つのマガキ DMT 様配列だけでなく、そのほかの貝類 DMT でも、この部分に 2 つの N 糖鎖付加部位を確認することはできなかった。従って、DMT と DMTRP に機能的な違いがあるとしても、この欠失部位の糖鎖付加は関与していない。

一方、膜貫通部位の位置は共通してよく保存されていることがわかった。また、DMT の機能に重要な役割を果たすと考えられている Consensus Transport Motif (CTM) は、

全配列でよく保存されていることが確認できた。これらは、DMT として機能するために重要な部位であると考えられる。

ヒト DMT1 は、4 つのアイソフォームが確認されている。3'UTR に ion-responsive regulatory-protein-binding site (IRE) を持つ配列 (Gunshin *et al.* 1997) と持たない配列 (Lee *et al.* 1998)、さらにそれぞれに対して、5'エクソンに Nuclear Localization signal (NLS) を持つものと持たないもの (Hubert and Hentze 2002) である。今回取得した配列には、IRE も NLS も確認されなかった。しかし、IRE を持つ配列が見られなかったことから、DMTRP はホタテガイ DMT 配列と同様に、発現が細胞内二価鉄濃度に依存しないことが示唆された。

一方、哺乳類の DMT1 において、輸送体としての機能上重要なアミノ酸残基が多数報告されているが、その多くがシチヨウシンカイヒバリガイ DMTRP および DMT においても保存されていた。まず、アフリカツメガエルの卵母細胞発現系の実験により、ヒト DMT1 の第一細胞外領域のいくつかのアミノ酸残基が、 $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ などの輸送特性及び取り込み量に変化をもたらすことが報告されているが (Cohen *et al.* 2003)、これらの多くは二枚貝の DMT、DMTRP において保存されていた。例えば、シチヨウシンカイヒバリガイにおいて 77 番目のグリシン (G-77)、82 番目のアスパラギン酸 (D-82)、84 番目のグルタミン (Q-84) がそれらに相当し、それぞれ保存されていた (図 8)。また、第 4 膜貫通部位にある、マウスとラットにおいて小球性貧血を起こす原因変異とされるグリシン (G-174) や、 $\text{Fe}^{2+}$ の取り込みに関わるフェニルアラニン (F-185) (Nevo and Nelson 2003) も二枚貝の DMT、DMTRP において保存されていた。さらに、酵母における発現実験により、金属輸送に必須であると報告された 3 つの負電荷アミノ酸 (2 つのアスパラギン酸、グルタミン酸) もすべての配列において保存されていた (D-75、D-181、E-288) (Forbs and Gros 2003)。また、第 6 膜貫通部位に存在する 2 つのヒスチジン (H-256、H-261) は、直接金属結合には関与しないものの、pH 制御に必須であると考えられているが、これらも保存されていた。人間の女性の深刻な低色素性小球性貧血と鉄過剰の患者から発見されたグルタミン酸 (E-365) の変異もみられなかった。以上より、シチヨウシンカイヒバリガイ DMTRP は、DMT に対して欠損部分を持つものの、機能上重要とされるアミノ酸残基はよく保存されており、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。

なお、機能上の重要性が示唆されているアミノ酸残基のうち、ホタテガイ及びマガキの DMT 様配列において、哺乳類において  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ の取り込み量にかかわるグルタミン (シチヨウシンカイヒバリガイ DMTRP における Q-84) が、例外的にアルギニンに変異していることがわかった。中性であるグルタミンが、アルギニンに変異することで塩基性となるため、立体構造に何らかの変化が生じるころが推定される。ホタテガイ DMT は

Ca<sup>2+</sup>の輸送を行うことが報告されているため (Toyohara *et al.* 2005)、シチヨウシンカイヒバリガイ DMT も、同様の性質を持つ可能性は十分考えられる。

#### 4-2. 他の貝類における DMTRP 遺伝子の探索

マガキも DMT 様配列を 2 つ持っていることが明らかとなった。それぞれ 4-1-2 において述べた、各種生物 DMT と共通の機能上重要と考えられるアミノ酸残基及び CTM は高く保存されていた。新規に発見した DMT 様配列において、グルタミン (シチヨウシンカイヒバリガイの Q-84 に相当) が、ホタテガイ DMT と同様アルギニンに変異していることがわかった。

#### 4-3. 分子系統解析

得られた分子系統樹では、シチヨウシンカイヒバリガイ DMT と DMTRP がそれぞれ異なるクレードに属することがわかった。また、シチヨウシンカイヒバリガイ DMTRP が属するクレードにマガキ DMT として GenBank に登録されている配列が、シチヨウシンカイヒバリガイ DMT が属するクレードにマガキの新規に取得した配列が含まれることから、マガキの 2 つの DMT 様配列は分子系統的な性質としては、マガキ DMT が DMTRP、新規に取得した DMT 様配列が DMTRP 様の機能を持つことが示唆された。

DMTRP の属するクレードが、各種生物 DMT が属するクレードと独立していることから、DMT 遺伝子と DMTRP 遺伝子の分化は原始的な真核生物において生じたことが示唆された。現段階で貝類以外からは DMTRP 様の配列が取得できていないことから、貝類以外の生物は DMTRP 様の遺伝子を喪失した可能性が考えられる。

#### 4-4. シチヨウシンカイヒバリガイの DMT、DMTRP 遺伝子発現の組織特異性

DMT は、足のどの部位でも発現量が高く、次いで外套膜 (内側)・閉殻筋・鰓・唇弁・生殖腺となった。この結果は、腸管において高発現であったホタテガイ DMT の結果と一致しない (Toyohara *et al.* 2005)。腸管で高発現となるのはヒトも同じだが (Gunshin *et al.* 1997)、シチヨウシンカイヒバリガイにおいて同様の結果が得られなかったのは、シチヨウシンカイヒバリガイが鰓に共生させている硫黄酸化細菌の生産する栄養に大きく依存しており、自身の消化器があまり機能していないことが原因ではないかと考えられる。足で全体的に高発現であったことに関して、足が自身の体を固定させるために分泌する足糸の作成を行う器官であり、イガイ類の一種において不要な重金属を足糸に排出するという報告があるため (Shaun and Szefer 2003)、このような結果になったのではないかと推察される。また、外套膜は、バイオミネラリゼーションによって貝殻形成に関与する器官であり、貝殻形成のために必要なカルシウムの蓄積や分泌、あるいは、足と同様、不要な重金属を貝殻に排出するために外套膜において高発現になったのではないかと考えられる。

次に DMTRP に関しては、使用したプライマーによって結果が異なった。5' DMTRP × sDMTRP-R では、全組織で一律に増幅が確認され、TPG-F × TSS-R では、DMT の結果と同様の傾向を示す結果が得られた。前者は増幅領域に第 2 章で判明した欠損部位を含まず、後者は含む点に違いがある。全組織で DMTRP 遺伝子の上流部のみを発現しており、DMT と同様の組織で全長を発現しているとも解釈できるが、欠失部位の周辺に PCR を阻害する何らかの要因がある可能性もある。この点についてはより詳細な検討が必要である。

#### 4-5. シチヨウシンカイヒバリガイの DMT 遺伝子の発現量解析

##### 4-5-1. 重金属曝露後の生残

重金属曝露を 7 日間行った後、各重金属群における生残個体数は表 4 のようになった。とくに極端な死亡率を示す金属種はなく、どの区も 1, 2 個体の死亡が認められた。しかし銅の LD50 の値はイガイにおいてカドミウム、鉛、亜鉛の中で最も低く、従って毒性が強いはずだが、唯一全個体が生き残った実験群となった。コントロール群でも死亡個体が出現したことから、採取後 1 か月近く経過していることもあり、死亡の原因は、個体の疲弊である可能性が考えられる。

##### 4-5-2. 重金属曝露による DMT 遺伝子の発現変動

リアルタイム PCR の結果、どの組織もコントロールと重金属曝露時の DMT の発現量に有意差は見られなかった。すなわち、今回検討した金属種は、DMT 遺伝子の発現を大きく変化させることはなかった。しかし、腸管においてカドミウムと亜鉛に、足においてカドミウムと亜鉛・水銀と亜鉛・鉄と亜鉛の間に有意差がみられた。全般的にカドミウム曝露により発現量は下がる傾向にあり（鰓を除く）、亜鉛曝露時には全般的に発現が上昇する傾向があるため、両者を比較した場合に差が有意になる場合があると考えられる。

DMTRP については、現状では配列のどの部分を用いて測定すべきかまだ結論できないため、金属曝露による発現変化を調べることができなかった。発現の領域特異性について結論が得られ次第、なるべく早く実施したい。

#### 5. 今後の展望

取得した欠失を含む DMTRP 遺伝子がプロセス型偽遺伝子であるのか、単なる PCR 酵素のエラーによるものなのか、対立遺伝子によるものなのかを明らかにするためには、ゲノムをテンプレートにシーケンスを行う必要がある。今回はシチヨウシンカイヒバリガイ DMT でしか曝露実験及びそれによる遺伝子の発現量解析を行わなかったが、シチヨウシンカイヒバリガイ DMTRP 遺伝子や、マガキの 2 つの DMTRP 遺伝子においても、同様の曝露実験、発現量解析を行う必要がある。また、各 DMT 様遺伝子においてアフリカツ

メガエルの卵母細胞発現系を用いた電気生理学的実験によって、それぞれの重金属ごとの輸送特性を確認する必要がある。

これらを行うことで、貝類の多様な環境適応能力の一端が解明されるものであると期待される。

## 謝辞

本研究を行うにあたり、終始適切なご助言を賜り、また丁寧にご指導くださった東京大学大気海洋研究所・分子海洋生物学分野の井上広滋教授に心より感謝申し上げます。また、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いただきました。新領域創成科学研究科博士課程3年の角村梓氏には、実験に関するたくさんの細やかな指導をいただきました。遠藤博寿博士には、実験計画の構築に欠かせない適格な助言をいただきました。吉田愛美博士には、実験に関する様々なテクニックを教授していただきました。新江ノ島水族館の根本卓氏には、航海中生物の管理をしていただいただけでなく、水族館にてシチヨウシンカイヒバリガイを預かっていただきました。日本大学生物資源科学部海洋生物資源科学科の小糸智子助教には、シチヨウシンカイヒバリガイの提供をしていただきました。地球海洋環境学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ました。惜しみない協力をいただきました以上の方々に、この文面を借りて心より御礼申し上げます。

また、研究で関わった以上の方々だけでなく、2年間の研究生活を支えてくだ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おいて研究を行えたことに、心より感謝申し上げます。

最後に、修士課程に進学することに賛成し、精神的に大きな支えとなってくくださった父・昌樹と母・雅子に心から感謝します。

## 引用文献

Bourgoin B (1990): *Mytilus edulis* shell as a bioindicator of lead pollution: considerations on bioavailability and variability: Marine Ecology Progress Series 61, 253-262

Capella-Gutierrez S, Silla-Martinez JM, Gabaldon T (2009): trimAl: a tool for automated alignment trimming in large-scale phylogenetic analyses, Bioinformatics 25, 1972-1973

Cohen A, Nevo Y, Nelson N (2003): The first external loop of the metal ion transporter DCT1 is involved in metal ion binding and specificity, Proceedings of National Academy of Science USA, 100, 10694–10699

Company R, Serafim A, Cosson RP, Fiala-Médioni A, Camus L, Serrão-Santos R, João Bebianno M(2010): Sub-lethal effects of cadmium on the antioxidant defence system of the hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus azoricus*, Ecotoxicology and Environmental Safety, 73, 788–795

Fleming MD, Trenor CC 3rd, Su MA, Foernzler D, Beier DR, Dietrich WF, Andrews NC (1997): Microcytic anaemia mice have a mutation in Nramp2, a candidate iron transporter gene. Nature Genetics 16, 383-386

Forbes JR, Gros P (2003): Iron, manganese, and cobalt transport by Nramp1 (Slc11a1) and Nramp2 (Slc11a2) expressed at the plasma membrane. Blood 102, 1884-1892

藤倉 克則 , 丸山 正, 奥谷 喬司 (2012): 潜水調査船が観た深海生物 深海生物研究の現在 第2版. 東海大学出版, 神奈川, 15-16pp, 75pp, 122pp

Gunshin H, Mackenzie B, Berger UV, Gunshin Y, Romero MF, Boron WF, Nussberger S, Gollan JL, Hediger MA (1997): Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. Nature 388, 482-488

Hardivillier Y, Denis F, Demattei M, Bustamante P, Laulier M, Cosson R (2006): Metal influence on metallothionein synthesis in the hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus thermophilus*, Comparative Biochemistry and Physiology Part C:



Toxicology & Pharmacology 143, 321–332

Hubert N, Hentze MW (2002): Previously uncharacterized isoforms of divalent metal transporter (DMT)-1: implications for regulation and cellular function. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 99, 12345-12350

飯笹 幸吉、石橋 純一郎、藤原 義弘、橋本 惇、堀井 善弘、石塚 治、小山 純弘、湯浅 真人(1999): 明神海丘のアクティブ熱水フィールドとブラックスモーカー, JAMSTEC 深海研究 14, 223-236

井上 広滋, 小糸 智子(2010): 熱水噴出域への適応機構をアミノ酸輸送体から探る. 海洋と生物 32, 123-128

Katoh K, Standley DM (2013): MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. (outlines version 7), Molecular Biology and Evolution 30, 772-780

Koschinsky A, Kausch M, Borowski C (2014): Metal concentrations in the tissues of the hydrothermal vent mussel I: Reflection of different metal sources, Marine Environmental Research 95, 62–73

Leef PL, Gelbart T, West C, Halloran C, Beutler E (1998): The Human Nramp2 Gene: Characterization of the Gene Structure, Alternative Splicing, Promoter Region and Polymorphisms, Blood Cells, Molecules, and Diseases 24, 199–215

Mackenzie B, Takanaga H, Hubert N, Rolfs A, Hediger MA (2007): Functional properties of multiple isoforms of human divalent metal-ion transporter 1 (DMT1), Biochemical Journal 403, 59–69

Marciani P, Trotti D, Hediger MA, Monticelli G (2004): Modulation of DMT1 activity by redox compounds. Journal of Membrane Biology 197, 91–99

丸茂 克美・藤本 ひかり, 武内 章記, 富安 卓滋・児玉谷 仁・河野 百合子, 山本 正浩, 嶋永 元裕, NT12-10 乗船研究者一同(2013): 明神海丘及び明神礁カルデラの海底熱水系の硫化物と堆積物の水銀濃度と水銀同位体組成, ブルーアース 2013 要旨集, BE13-25

Muralidharan S, Thompson E, Raftos D, Birch G, Haynes PA (2012): Quantitative proteomics of heavy metal stress responses in Sydney rock oysters, *Proteomics*. 12, 906-921

Nevo Y, Nelson N (2004): The mutation F227I increases the coupling of metal ion transport in DCT1. *Journal of Biological Chemistry* 279, 53056-53061

Nevo Y, Nelson N (2006): The NRAMP family of metal-ion transporters. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* 1763, 609–620

Nicholson S, Szefer P (2003): Accumulation of metals in the soft tissues, byssus and shell of the mytilid mussel *Perna viridis* (Bivalvia: Mytilidae) from polluted and uncontaminated locations in Hong Kong coastal waters. *Marine Pollution Bulletin* 46, 1040–1043

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, 129-135

Okubo M, Yamada K, Hosoyamada M, Shibasaki K, Endou H (2003): Cadmium transport by human Nramp 2 expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *Toxicology and Applied Pharmacology* 187, 162–167

Radisky D, Kaplan J (1999): Regulation of transition metal transport across the yeast plasma membrane. *Journal of Biological Chemistry* 274, 4481-4484

Sacher A, Cohen A, Nelson N.(2001): Properties of the mammalian and yeast metal-ion transporters DCT1 and Smf1p expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *Journal of Experimental Biology* 204, 1053-61

佐々木 猛智 (2010) : 貝類学. 東京大学出版会

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）

Stamatakis A (2006): RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models, *Bioinformatics* 2006, 2688-2690

Stamatakis A, Hoover P, Rougemont J (2008): A rapid bootstrap algorithm for the RAxML web servers. *Systematic Biology* 57, 758-771

Tandy S, Williams M, Leggett A, Lopez-Jimenez M, Dedes M, Rameshi B, Sraii SK, Sharp P (1999): Nramp2 expression is associated with pH-dependent iron uptake across the apical membrane of human intestinal Caco-2 cells. *Journal of Biological Chemistry* 275, 1023–1029

Toyohara H, Yamamoto S, Hosoi M, Takagi M, Hayashi I, Nakao K, Kaneko S (2005): Scallop DMT functions as a Ca<sup>2+</sup> transporter. *FEBS Letters* 579, 2727–2730