OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Functional analysis of Daphnia magna ABCG transporter, Scarlet
Author(s)	Ismail, Nur Izzatur Binti
Citation	大阪大学, 2021, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/85281
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

Form 3

Abstract of Thesis

Name （NUR IZZATUR BINTI ISMAIL）	
Title	Functional analysis of *Daphnia magna* ABCG transporter, Scarlet （オオミジンコにおけるABCGトランスポーター、Scarletの機能解析）

ABC transporters are a superfamily of transmembrane transporter proteins that utilize ATP energy to transport large diversity of substrates across its membrane protein. The ABC transporter can be divided to eight subfamilies, type A to H in arthropods. At present, the genome-wide assay on ABC subfamilies of few arthropods species have been performed, but the knowledge and role of each of the ABC transporters are still limited. Among all characterized ABC proteins so far in arthropods, *Drosophila melanogaster* ABCG transporter and its insect orthologues are the most thoroughly characterized ABC transporters. It is known that ABCG transporter are pigment-transporting ABC transporter and recent evidence in *Drosophila* suggests additional neurobiological function. However, nothing is known for function of ABCG transporter in crustacean species, even though this species plays a central importance for the ecology of aquatic environment. Thus, in this study, I chose *D. magna* as my model species to elucidate function of ABCG transporter, since this species have full complete genome sequence data available and most established functional genomics tools among crustacean species.

In order to elucidate function of ABCG transporter, I first investigated ABCG transporter, *white*, *scarlet*, and *brown* in *D. magna* genome. Amino acid sequence alignment and phylogenetic analysis suggested that *D. magna* has six *white* and one *scarlet* orthologs, but lacks the *brown* ortholog. Due to the multiplicity of *white* orthologs, I analyzed the function of the *scarlet* ortholog using CRISPR/Cas9 system. According to the result of functional analyses via CRISPR/Cas9, loss function at *scarlet* locus confirmed the role of *D. magna scarlet* as pigment transporting ABC transporter.

Generated *D. magna st* mutant exhibits spinning behaviour differ than wild type. First, I investigated mutant spinning behaviour under light/dark conditions and discovered that this behaviour is partly associated with the presence of light. Further analysis on metabolomics of a juvenile mutant revealed that the mutant has approximately one-tenth of the histamine content of the wild type and this behaviour could be rescued under histamine exposure in juvenile mutant, suggesting that Scarlet plays an important role in histaminergic signaling, which might be related to control the spinning behaviour. However, the altered behaviour was not rescued in the adult mutant by the addition of histamine, suggesting Scarlet plays an irreversible role in the development of histaminergic neurons.

Taken together, for the first time, the function of ABCG transporter Scarlet in *Daphnia* species was identified. This study highlights the role of Scarlet as pigment transporter and possible role in histaminergic signaling. The findings in this study would facilitate an insight into how light regulate the swimming behaviour, and factors related to light swimming behaviour can be eliminated during behaviour evaluation assay such as toxicity test. On the other hand, generated *D. magna st* mutant is also attractive to be used as marker for genetic transformation due to its easy identification to screen transgenic *Daphnia*.

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名	（　NUR IZZATUR BINTI ISMAIL ）		
論文審査担当者		(職)	氏　　名
	主 査	教授	渡邉　肇
	副 査	教授	村中　俊哉
	副 査	教授	藤山　和仁
	副 査	教授	福﨑　英一郎
	副 査	教授	内山　進
	副 査	教授	紀ノ岡　正博
	副 査	教授	大政　健史
	副 査	教授	本田　孝祐
	副 査	教授	永井　健治
	副 査	教授	栗栖　源嗣

論文審査の結果の要旨

本論文は、生態系において重要な位置を占める動物プランクトンの１種であるオオミジンコ(*Daphnia magna*)において重要な機能を担っている膜輸送タンパク質である Scarlet に関する研究をまとめたものであり、緒言、総括を含む４章から構成される。

緒言となる第１章では、本研究の背景と目的、およびその意義について記述している。

第２章では、ABCG トランスポーターに分類される Scarlet 遺伝子の機能を解析するために、まずデータベース上でミジンコにおける ABCG トランスポーターの探索を行っている。その結果、Scarlet 遺伝子はゲノム中に１つしか存在しないのに対して、類似遺伝子である White は６つのパラログが存在することを明らかにしている。さらに Scarlet 遺伝子については CRISPR/Cas9 を用いて当該遺伝子を破壊したオオミジンコの系統を作製している。その結果、この Scarlet 遺伝子を破壊した系統では、通常黒色の眼の色素が合成されず透明な眼を有することを見出しており、眼において色素合成に必須の分子の輸送に関与していることを明らかにしている。

第 3 章では、この当該遺伝子を破壊したオオミジンコの系統をさらに解析することにより、当該遺伝子が破壊されたミジンコは行動異常が引き起こされていることを見出している。この行動異常は生育が進むにつれて顕著になり、恒常的な回転行動を示すことを明らかにしている。さらにこのミジンコのメタボローム解析を行うことにより、ヒスタミンの量が顕著に低下していることを明らかにしている。この欠乏しているヒスタミンを飼育水中に添加することで補填すると、異常行動が抑制されることを見出しており、Scarlet はヒスタミン輸送においても重要な機能を果たしていることを明らかにしている。

第４章では、これら得られた知見を総括し、今後の展望について総括している。

以上のように、本論文は生態系でも重要な位置を占める動物プランクトンについて、その重要な膜タンパク質である Scarlet の機能を明らかにするものである。動物プランクトンは、環境変化に応じた生殖戦略をとっていることは古くから知られるが、生体内での重要な遺伝子の機能についてはほとんど明らかにされていなかった。生態系を構成する種々の生物の中で、一次消費者である動物プランクトンは重要な位置を占めていることから、動物プランクトンの行動に影響を及ぼす膜タンパク質の機能を明らかにしたことは、環境保全や環境影響評価などにおいても非常に重要であり、本論文の意義は大きい。

よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。