

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14601

研究課題名(和文)シアノバクテリアの持つロドプシンの機能解析：彼らは光をどう使い分けるのか？

研究課題名(英文)Functional analysis of cyanobacterial rhodopsins: How do they use the two different phototrophic systems.

研究代表者

吉澤 晋 (Yoshizawa, Susumu)

東京大学・大気海洋研究所・准教授

研究者番号：00553108

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：シアノバクテリア (*Synechocystis* sp. PCC 7509) から未知ロドプシンを見出しSyHRと命名した。異種発現系を用いた機能解析の結果、SyHRは光でCl<sup>-</sup>やSO<sub>4</sub><sup>2-</sup>を細胞内に輸送することが示された。また分光解析の結果、SyHRは緑色(約540 nm)の光を利用することが分かった。本研究で、シアノバクテリアの持つSyHRがクロロフィルが利用しない緑色の光を利用し、陰イオンを能動的に細胞内に輸送することが明らかになった。また、これまでに二価の陰イオンを輸送するロドプシンは見つかっておらず、本研究で初めてその存在が示された。

研究成果の概要(英文)：A novel rhodopsin was discovered from cyanobacteria (*Synechocystis* sp. PCC 7509) and named SyHR. Functional analysis showed that SyHR functions as light-driven inward anion (Cl<sup>-</sup> and SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) pump. Spectroscopic analysis revealed that SyHR utilize green light (about 540 nm). These results showed that cyanobacterial SyHR actively transports anion using green light not absorbed by chlorophyll. Also, the rhodopsin which transports divalent anions has not been found so far, and a first light-driven divalent anion pump was shown in this study.

研究分野：海洋微生物学

キーワード：ロドプシン シアノバクテリア バクテリア 微生物生態

### 1. 研究開始当初の背景

生物は太陽光エネルギーをどのような機構で化学エネルギーに変換しているのか？次世代シーケンサーの登場により機能未知光受容体配列（ロドプシン）が爆発的なスピードで蓄積する近年において、その利用機構はこれまで考えられていた以上に多様であることが分かってきた。

研究代表者が近年公開されたシアノバクテリアの大規模ゲノムデータを精査した結果、数多くのシアノバクテリアが機能未知ロドプシン遺伝子を持つことが分かった。しかしながら、これらの未知ロドプシンが光合成を行うシアノバクテリア細胞内でどのように働いているのかは全く分かっていない。

### 2. 研究の目的

本研究では、シアノバクテリアの持つ未知ロドプシン配列及びその機能を網羅的に明らかにし、これまで考えられてこなかった光合成とロドプシン、これら2つの光エネルギー利用機構がどのように「機能」および「光の色」の使い分けを行っているのかを明らかにすることを目的として行った。

### 3. 研究の方法

- ・シアノバクテリアロドプシンの網羅的探索  
シアノバクテリアの大規模ゲノムデータを対象とし、ロドプシン遺伝子配列の網羅的探索を行った。
- ・シアノバクテリア未知ロドプシンの機能解析

シアノバクテリアの持つロドプシン配列から機能が不明の未知ロドプシン配列の選抜し、それらの配列の全遺伝子合成を行い、大腸菌を用いた異種発現系を用いることで未知ロドプシンの機能解析を実施した。また精製した異種発現ロドプシンを用いて、分光学的特性を調べた。

- ・シアノバクテリア細胞内でのロドプシンの生理的役割解明

モデルシアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 株を用いて、ロドプシンの異種発現を実施した。得られた組み換えシアノバクテリアを用いて、ロドプシンの生理的役割の解明を試みた。

### 4. 研究成果

シアノバクテリアの大規模ゲノムデータを対象としたロドプシン探索から約30の配列を得ることに成功した。それらのアミノ酸配列を膜貫通予測、保存領域予測及び機能既知ロドプシン配列との比較を実施した結果、淡水性シアノバクテリアのみが保有する機能未知ロドプシンクレードが存在することが明らかになった(図1)。それらの配列を人工的に合成し、大腸菌を用いた異種発現系で解析した結果、シアノバクテリアの持つ未知ロドプシンは光エネルギーで内向きに陰イオン輸送

を行うことが分かった。また、*Synechocystis* sp. PCC 7509 の持つ未知ロドプシン (SyRH と命名) を用いて、イオン輸送の基質特異性や分光学的特徴を調べた。その結果、SyHR は光エネルギーで Cl<sup>-</sup> や BR<sup>-</sup> の他に二価の陰イオンである硫酸イオン (SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) を輸送することが明らかになった(図2)。これまで一価イオンを輸送するロドプシンしか報告がなく、本研究で初めて二価イオンを輸送するロドプシンが見つかった。

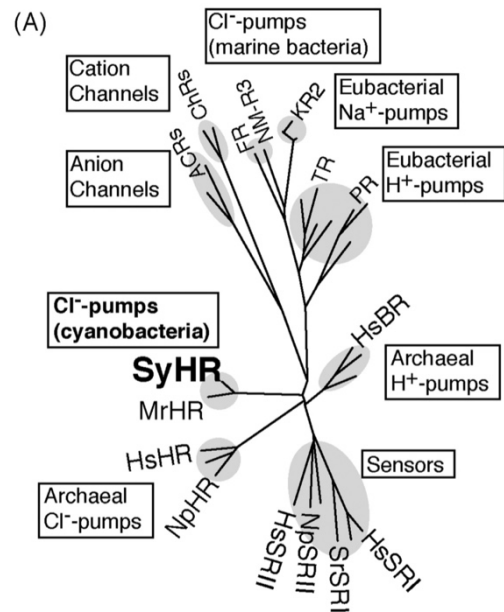


図1. シアノバクテリアロドプシン SyHR の系統的位置

また精製したロドプシタンパク質を用いた分光解析から、SyHR の極大波長は Cl<sup>-</sup> 存在下では 536nm、SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> 存在下では 542nm であることが分かった(図3)。存在する陰イオンの種類で多少の違いが生じるが、クロロフィルが利用しない緑色の波長帯の光を用いることが分かった。このことは、シアノバクテリアがクロロフィルとロドプシンを用いることで、異なる波長の光を効率良く利用していることを示唆している。

上記の結果から、SyHR は Cl<sup>-</sup> や SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> などの幅広い陰イオンを輸送するロドプシンであることが明らかになった。しかしながら、SyHR は淡水性シアノバクテリアゲノムから見出されており、実際の生息環境では Cl<sup>-</sup> や SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> がほとんど存在しないと考えられる。そのため、SyHR の細胞内での役割は依然不明である。そこで、モデルシアノバクテリア PCC 6803 ゲノムに SyHR の相同組み換えを行い、異種発現させることを試みた。その結果、PCC 6803 ゲノムに SyHR を組み込むことに成功した。今後、得られた変異株を用いて SyHR の細胞内での生理的役割を解明する。

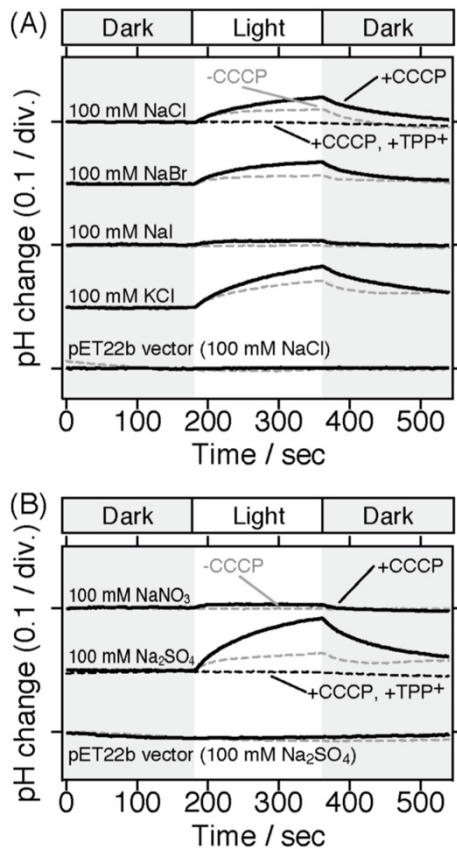


図2. SyHRの光によるイオン輸送  
(A) 一価陰イオンの輸送特性  
(B) 二価陰イオンの輸送特性

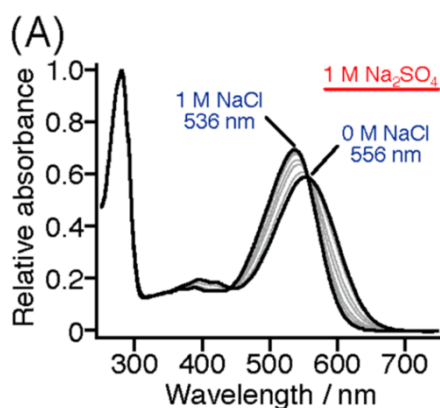


図3. 1M NaCl及び1M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>溶液中でのSyHRの吸収スペクト

5. 主な発表論文等  
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

- ① Yu Nakajima, Takashi Tsukamoto, Yohei Kumagai, Yoshitoshi Ogura, Tetsuya Hayashi, Jaeho Song, Takashi Kikukawa, Makoto Demura, Kazuhiro Kogure, Yuki Sudo and Susumu Yoshizawa. **Presence of a haloarchaeal halorhodopsin-like Cl<sup>-</sup> pump in marine bacteria.** *Microbes and Environments*, 33, 89-97. (2018)  
DOI:10.1264/jsme2.ME17197
- ② Yu Nakajima, Susumu Yoshizawa, Sanghwa Park, Yohei Kumagai, Shu-Kuan Wong, Yoshitoshi Ogura, Tetsuya Hayashi and Kazuhiro Kogure. **Draft Genome Sequence of *Rubricoccus marinus* SG-29<sup>T</sup>, a Marine Bacterium within the Family Rhodothermaceae, Which Contains Two Different Rhodopsin Genes.** *Genome announcements*, 5: e00990-17. (2017) DOI: 10.1128/genomeA.00990-17.
- ③ Akiko Niho<sup>▽</sup>, Susumu Yoshizawa<sup>▽</sup>, Takashi Tsukamoto<sup>▽</sup>, Marie Kurihara, Shinya Tahara, Yu Nakajima, Misao Mizuno, Hikaru Kuramochi, Tahei Tahara, Yasuhisa Mizutani, and Yuki Sudo. **Demonstration of a Light-Driven SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> Transporter and Its Spectroscopic Characteristics.** *Journal of the American Chemical Society*, **139**: 4376–4389. (2017) DOI: 10.1021/jacs.6b12139 ( <sup>▽</sup> A.N., S.Y., and T.Ts. contributed equally to this work.)

[学会発表] (計7件)

- ① 吉澤晋. ロドプシン保持細菌の例から考える、光従属栄養性のメリットとデメリット. 2018年度第3回光合成細菌ワークショップ(第59回植物生理学会年会内で開催). 札幌コンベンションセンター, 札幌. Mar. 27, 2018.
- ② 吉澤晋. シアノバクテリアの持つ光駆動型イオン輸送ロドプシン-彼らはどのよ

うな環境で、どのイオンを輸送しているのか?-. ラン藻ゲノム交流会 2016, 東京大学駒場キャンパス 16 号館, 東京. Jun. 25, 2016.

- ③ 長谷川万純, 前田海成, 池内昌彦, 吉澤晋. シアノバクテリアの新たな光利用: ロドプシンによる炭酸取り込みの検証. 藍藻の分子生物学 2017. かずさアカデミアホール, 木更津市. Dec. 2017.
- ④ ○Takashi Tsukamoto, Susumu Yoshizawa, Takashi Kikukawa, Makoto Demura, Yuki Sudo. 古細菌型 TSA モチーフ配列をもつ真正細菌由来ハライドイオンポンプロドプシンの光反応解析 (Cl<sup>-</sup>-pumping Photoreaction of a Bacterial Halide-ion Pumping Rhodopsin with an Archaeal-type TSA motif). 第 54 回日本生物物理学会年会, つくば国際会議場, つくば. Nov. 25-27, 2016
- ⑤ 仁保亜紀子, 吉澤晋, 中島悠, 塚本卓, 須藤雄気. *Synechocystis* sp. PCC 7509 由来の新規光駆動アニオンポンプの機能解析. 第 53 回日本生物物理学会年会, 金沢大学角間キャンパス自然科学本館, 金沢. Sep. 13-15, 2015.
- ⑥ 吉澤晋. 淡水性シアノバクテリアの持つ光駆動型陰イオン取り込みロドプシン-彼らは淡水環境でどのイオンを輸送しているのか?-. 藍藻の分子生物学 2015. かずさアカデミアホール, 千葉. Nov. 16-17, 2015.
- ⑦ 熊谷洋平, 吉澤晋, 渡辺麻衣, 池内昌彦, 木暮一啓, 岩崎渉. 「光合成」と「ロドプシン」、二つの異なる光利用システムを繋げる未知遺伝子 DUF2237 の機能解析. 藍藻の分子生物学 2015. かずさアカデミアホール, 千葉. Nov. 16-17, 2015.

[その他]

プレスリリース:光ではたらく硫酸イオン輸送体「SyHR」を発見 これまでに例のない機能を持つことが判明

[https://www.okayama-u.ac.jp/tp/release/release\\_id464.html](https://www.okayama-u.ac.jp/tp/release/release_id464.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

吉澤 晋 (YOSHIZAWA, Susumu)

東京大学・新領域創成科学研究科・准教授

研究者番号: 00553108