

令和元年5月17日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K14044

研究課題名(和文)光エネルギーによる環境浄化微生物の設計

研究課題名(英文)Solar-powered bioremediation by bacterial transporters

研究代表者

出村 誠 (Demura, Makoto)

北海道大学・先端生命科学研究院・教授

研究者番号：70188704

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：環境を光によって浄化する大腸菌の作製を目指して、光駆動型イオンポンプ膜蛋白質である微生物型ロドプシンと、様々な薬物を膜輸送できる多剤排出蛋白質を大腸菌細胞内で共役させ、薬物輸送を光によって駆動することを試みた。その結果、大腸菌内では、Na⁺を介した共役が有利であることを見出した。また、環境浄化大腸菌作製に有用と考えられる、強い内向きH⁺ポンプ活性を持った微生物型ロドプシンを南極で単離された真正細菌から見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細菌の細胞膜には種々の物質輸送蛋白質が存在する。本研究では、微生物型ロドプシンと多剤排出蛋白質の2種の蛋白質に注目した。微生物型ロドプシンは、光をエネルギー源として細胞膜を隔てたH⁺やNa⁺の濃度勾配を作り出すことができる。一方、多剤排出蛋白質は、これらのイオン濃度勾配を利用して、様々な薬物を膜輸送できる。これらを組み合わせることで、太陽光をエネルギー源として、環境中の様々な薬物を細胞内へ蓄積する「環境浄化細菌」を作製できる可能性がある。この作製のために、1)薬物輸送の効率を高める方法の検討、2)既存の微生物型ロドプシンの機能強化、3)高い機能を持つ微生物型ロドプシンの探索を行った。

研究成果の概要(英文)：We aimed to make an energy-coupling system between light-driven ion-pumping microbial rhodopsins and ion-coupled multidrug transporters for future development of a solar-powered bioremediation by bacterial cells. The results could be summarized as follows: 1) Compared to H⁺ pump rhodopsin, Na⁺ pump rhodopsin was revealed to efficiently drive the drug transporter, 2) From a Gram-positive bacterium inhabiting Antarctica, we found a strong inward H⁺ pump rhodopsin, which might be utilized to drive the inward multidrug transport.

研究分野：生物物理学

キーワード：イオンポンプ プロトンポンプ ナトリウムポンプ 多剤排出

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

1) 多くの単細胞微生物の細胞膜には、光をエネルギー源として、種々のイオンを輸送する膜タンパク質「微生物型ロドプシン」が存在する。近年、これらが細胞膜電位を過分極、あるいは脱分極する能力が注目されるようになり、特定の神経細胞の活動を光によって活性化したり、不活性化することに用いられるようになった。オプトジェネティクスと呼ばれるこの手法は、神経細胞ネットワークの解析や、神経性疾患の原因解明のために広く用いられるようになってきている。通常のオプトジェネティクスでは、微生物型ロドプシンを「光を情報源として用い、細胞に状態変化を起こすため」に使用しているが、微生物型ロドプシンの多くはイオンを能動輸送できるため、「光をエネルギー源として用い、細胞に仕事をさせる」ことも可能であると考えられる。

2) バクテリアの細胞膜には、 H^+ や Na^+ の電気化学ポテンシャル勾配を利用して、細胞内に流入した毒物を細胞外へ排出する多剤排出蛋白質が存在する。多くの膜輸送蛋白質は、構造が類似した物質しか輸送できないが、多剤排出蛋白質は、構造やサイズ、電荷などが異なる様々な物質を輸送できる特殊な蛋白質である。 H^+ や Na^+ と共役する多剤排出蛋白質は、通常、これらのイオンの細胞流入と共役して、毒物を排出するが、 H^+ や Na^+ の電気化学ポテンシャル勾配が逆向きであれば、輸送方向が逆転し、毒物を細胞内へ輸送する。

3) シアノバクテリア *Anabaena* の光センサーとして機能する微生物型ロドプシン (*Anabaena* sensory rhodopsin, ASR) は、弱いながらも内向きに H^+ を輸送することが報告されている。この活性を変異導入によって強化できれば、多剤排出蛋白質を逆向き駆動させ、環境を浄化するように働くバクテリアを作製できる可能性がある。

2. 研究の目的

1) 新しいオプトジェネティクスの試みとして、微生物型ロドプシンによって、多剤排出蛋白質を光駆動することを目指し、そのための効率の良い共役系を検討した。

2) 光エネルギーによって環境を浄化するバクテリアの作製を見据えて、 H^+ を細胞内向きに輸送するロドプシンの活性強化や、より強力な活性を持つロドプシンの探索を行った。

3. 研究の方法

1) 大腸菌細胞膜へイオンポンプ型ロドプシンと多剤排出蛋白質を共発現させ、両者の共役を試みた。大腸菌には BL21, C43(DE3), UT5600 株を用い、発現ベクターとしては、pET21c, pBAD33, pFLAG-CTC を用いた。イオンポンプ型ロドプシン自身の輸送活性は、光照射に伴う細胞懸濁液の pH 変化によって定量した。 H^+ ポンプ型ロドプシンの場合は、このロドプシンが引き起こす pH 変化を直接観測することになる。一方、 Na^+ ポンプ型ロドプシンの場合は、 Na^+ 輸送で生じた膜電位を打ち消すように、二次的な H^+ 輸送が起こる。これに伴う pH 変化を観測する。多剤排出蛋白質の輸送活性は、ethidium あるいは N-phenyl-1-naphthylamine (NPN) を基質として用いて、これらが輸送されることに伴う蛍光強度変化によって定量した。

2) 微生物型ロドプシンの詳細な機能解析を行うため、野生型、及び、アミノ酸置換変異体は大腸菌発現系を用いて精製した。これらを脂質膜へ再構成し、過渡吸収分光測定と、indium-tin oxide (ITO) 電極による H^+ 移動反応の解析に用いた。微生物ロドプシンは、色素レチナルを内包するため、可視光領域に吸収を持つ。光照射されると、種々の構造の異なる中間体を経て、また元に戻る光反応サイクルを示し、この間に機能を発現する。過渡吸収分光測定では、パルスレーザによって、瞬間的に光反応サイクルを開始させ、その後の中間体の出現を、それぞれの吸収波長の違いによって検出した。これによって、光反応サイクルの速度や、出現する中間体の種類やタイミングを調べた。また、ITO 電極は応答速度の速い pH 電極として機能する。ITO 電極上に微生物ロドプシンを吸着させ、パルスレーザで光反応を開始させた。光反応中に H^+ ポンプ型ロドプシンが起こす H^+ 放出、あるいは取込み反応を電極電位の時間変化として検出した。これによって、 H^+ 移動反応に関わる中間体とアミノ酸残基を推定した。

4. 研究成果

1) ASR の H^+ 移動反応に関わる残基の解析を行い、内向き H^+ ポンプ活性を強化するための変異を検討した。全ての微生物型ロドプシンは、色素レチナルを特定の Lys 残基とのシッフ塩基結合を介して内包している。ASR のシッフ塩基は暗状態においてプロトン化しており、光照射に伴って、この脱プロトン化とそれに続く多段階の H^+ 移動反応が起こる。その結果、弱い内向き輸送が起こると考えられるが、 H^+ 移動の詳細は不明であった。種々のアミノ酸置換変異体に対して、ITO 電極を用いた解析を行ったところ、シッフ塩基から細胞質側チャネルに位置する Asp217 への H^+ 移動、細胞質側表面に位置する Glu36 による溶媒からの H^+ 取込み、Asp217 から細胞質側溶媒への H^+ 移動、Glu36 からシッフ塩基への H^+ 移動、が大部分の ASR で起こっていることが判った。これは細胞質側の H^+ 循環反応であるが、一部の ASR では、細胞外側から H^+ を取り込むため、正味では内向きの H^+ ポンプ活性が観測されることが考えられた。そこで、細胞

質側からの H⁺取込みを抑制することで、内向き H⁺ポンプ活性が増大することを期待して、Glu36 を非解離性アミノ酸へ変異させた。さらに、細胞外側からの H⁺取込み量の増大を期待して、細胞外側チャネルに位置する複数の疎水性残基を親水性残基へ変異させた。しかし、活性の上昇は僅かであった。より大きな活性上昇のためには、荷電性残基を導入するなど、さらに効果が強い変異を加える必要があると考えられた。

2) イオンポンプ型ロドプシンと多剤排出蛋白質が共役可能であることを確認するため、両者を大腸菌細胞へ共発現させた。

2-1) H⁺共役の試み

外向き H⁺ポンプ型ロドプシンと H⁺共役型多剤排出蛋白質の大腸菌における共発現系を構築した。H⁺ポンプ型ロドプシンには、古細菌由来の Deltarhodopsin, シアノバクテリア由来の *Gloeobacter* rhodopsin, 海洋性プロテオバクテリア由来の proteorhodopsin を用いた。一方、H⁺共役型多剤排出蛋白質には、枯草菌由来の EbrAB, 及び、大腸菌由来の AcrAB を用い、輸送基質には ethidium を使用した。EbrAB は最も小型の多剤排出蛋白質ファミリーである SMR ファミリーに属する。AcrAB は、大型で最も強力な多剤排出蛋白質ファミリーである RND ファミリーに属する。いずれの H⁺ポンプ型ロドプシンも、それら単独では、大量に大腸菌細胞に発現し、強力な H⁺ポンプ活性を示した。多剤排出蛋白質も同様に、それら単独では、強力な ethidium の排出活性を示した。しかし、共発現させた場合、何の組み合わせにおいても、また、検討した何のプロモータと発現条件においても、両者の発現量が激減してしまい、H⁺ポンプ型ロドプシンの光励起に伴う ethidium の排出は観測されなかった。

2-2) Na⁺共役の試み

大腸菌の細胞膜には、H⁺を輸送する経路が多数存在する。それらからの H⁺のリークによって、H⁺ポンプ型ロドプシンが作り出す H⁺の電気化学ポテンシャル勾配が減弱される可能性がある。このことも、多剤排出蛋白質を駆動できない要因であると考えられた。そこで、Na⁺共役を試みた。Na⁺ポンプ型ロドプシンには、真正細菌 *Indibacter alkaliphilus* 由来の IaNaR を、Na⁺共役型トランスポーターには、淋菌由来の NorM を用いた。やはり双方の発現量は単独発現時よりも大きく減弱してしまった。しかし、この共発現系では、IaNaR の光照射に伴い、細胞内に蓄積させた NPN の約 20%の排出が観測された。大腸菌細胞では Na⁺の透過経路が少ないために、H⁺共役よりも Na⁺共役の方が、効率よく多剤排出蛋白質を駆動できることが示唆された。H⁺共役の場合は、より強力な H⁺の電気化学ポテンシャル勾配を形成する必要があると考えられる。

3) 上述した通り、イオンポンプ型ロドプシンと多剤排出トランスポーターを共役させるには、イオンの強い電気化学ポテンシャル勾配を形成する必要がある。ASR は内向き H⁺ポンプ活性を示すが、その活性は外向き H⁺ポンプ型ロドプシンの 1/10 以下である。最近、ASR が属する xenorhodopsin (XeR) ファミリーから、内向き H⁺ポンプとして機能するロドプシンが相次いで報告された。XeR ファミリーに属するロドプシンは多数存在するため、さらに強力なポンプが存在するかもしれない。そこで、XeR ファミリーの進化系統樹解析を行い、進化的に離れた 11 種類の XeR を選抜し、それらの大腸菌発現系を構築した。11 種には、最近、報告された内向き H⁺ポンプも含めた。それらの輸送活性を測定した結果、南極大陸で単離された真正細菌の持つ XeR (DmXeR) が最も活性が強く、その強度は ASR の約 7 倍であることが解った。さらに、強い活性を実現する仕組みを明らかにするため、種々のアミノ酸変異体と ITO 電極を用いた解析を行った。その結果、DmXeR でも、ASR の E36, D217 は保存されているが、それらの役割は全く異なることが判った。DmXeR では、E36 は H⁺移動反応に関与していないと考えられた。また、D217 を N に置換しても、H⁺移動反応自体は野生型 DmXeR と大きく変化しなかったが、内向き H⁺ポンプ活性は消失した。よって、D217 は H⁺移動反応には直接は関わらないが、H⁺移動方向を制御するために重要な役割を果たすと考えられた。

4) 本研究より、イオンポンプ型ロドプシンと多剤排出蛋白質の大腸菌内での共役には、Na⁺共役が有効であると示唆された。よって、内向きに Na⁺をポンプするロドプシンを作成することで、多剤排出蛋白質による薬物の細胞取り込みを駆動できるようになるかもしれない。一方、H⁺共役のためには、Na⁺の場合よりも強力な H⁺の電気化学ポテンシャルを形成する必要がある。様々な XeR の活性を調べた結果、最も強い内向き H⁺ポンプ活性を持つ DmXeR を見出した。この発現量を多剤排出蛋白質との共発現時にも維持することで、H⁺共役によっても、多剤排出蛋白質による薬物の内向き輸送を実現できるかもしれない。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計2件)

Hasemi, T., Kikukawa, T., Watanabe, Y., Aizawa, T., Miyauchi, S., Kamo, N., Demura, M., Photochemical study of a cyanobacterial chloride-ion pumping rhodopsin, 2019, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1860: 136-146
DOI: 10.1016/j.bbabi.2018.12.001 査読有

Nakamura, S., Kikukawa, T., Tamogami, J., Kamiya, M., Aizawa, T., Hahn, M.W., Ihara, K., Kamo, N., Demura, M., Photochemical characterization of actinorhodopsin and its functional existence in the natural host, 2016, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1857: 1900-1908
DOI: 10.1016/j.bbabi.2016.09.006 査読有

[学会発表](計10件)

加藤朝也, 村部圭祐, 菊川峰志, 塚本卓, 相沢智康, 出村誠, Photochemical analysis of sodium ion-pumping rhodopsin from *Indibacter alkaliphilus*, 第56回日本生物物理学会年会, 岡山大学(岡山県・岡山市), 2018年9月16日

村部圭祐, 菊川峰志, 塚本卓, 相沢智康, 出村誠, イオン選択膜を用いた Na⁺ポンプ型ロドプシンの機能解析, 第45回生体分子科学討論会, 大阪市立大学(大阪府・大阪), 2018年6月22日

Okamura, A., Kikukawa, T., Tsukamoto, T., Aizawa, T., Kamo, N., Demura, M., Functional analyses of Na⁺-pumping rhodopsin focusing on acidic residues on the extracellular surface, 第55回日本生物物理学会年会, 熊本大学(熊本県・熊本), 2017年9月21日

Iizuka, A., Kikukawa, T., Kajimoto, K., Fujisawa, T., Tsukamoto, T., Aizawa, T., Kamo, N., Unno, M., Demura, M., Functional importance of trimer formation of light-driven H⁺ pump *Gloeobacter* rhodopsin, 第55回日本生物物理学会年会, 熊本大学(熊本県・熊本), 2017年9月21日

Abe, S., Kikukawa, T., Tsukamoto, T., Aizawa, T., Kamo, N., Demura, M., Functional analysis of T126E mutant of *Natronomonas pharaonis* halorhodopsin, 第55回日本生物物理学会年会, 熊本大学(熊本県・熊本), 2017年9月21日

Murabe, K., Kikukawa, T., Tsukamoto, T., Aizawa, T., Kamo, N., Demura, M., Analysis of Na⁺ transfer reactions of Na⁺-pumping rhodopsin, 第55回日本生物物理学会年会, 熊本大学(熊本県・熊本), 2017年9月20日

Kikukawa, T., Hasemi, T., Aizawa, T., Kamo, N., Demura, M., Photochemistry of cyanobacterial chloride ion-pumping rhodopsin, 19th International Union for Pure and Applied Biophysics Congress and 11th European Biophysics Congress, エジンバラ国際会議場(イギリス・エジンバラ), 2017年7月19日

Hasemi, T., Kikukawa, T., Aizawa, T., Kamo, N., Demura, M., Photocycle of *Mastigocladopsis repens* halorhodopsin and the role of its TSD motif, 第54回日本生物物理学会年会, つくば国際会議場(茨城県・つくば), 2016年11月27日

Nishiya, K., Sasaki, S., Tamogami, J., Kikukawa, T., Aizawa, T., Kamo, N., Demura, M., Replacements of "donor" residues in the light-driven H⁺-pump rhodopsins, 第54回日本生物物理学会年会, つくば国際会議場(茨城県・つくば), 2016年11月25日

Tamaki, H., Saito, Y., Egawa, A., Kikukawa, T., Fujiwara, T., Demura, M., Solid-state NMR analysis of sodium ion pump rhodopsin and its Na⁺-binding, 17th International Conference on Retinal Proteins, ポツダム大学(ドイツ・ポツダム), 2016年10月03~04日

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：菊川 峰志

ローマ字氏名：(KIKUKAWA, takashi)