

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19134

研究課題名（和文）酵素型ロドプシン：光でON-OFFする酵素が描く新しい微生物の生き様

研究課題名（英文）Enzyme-Type Rhodopsins: Unveiling the Role of Light-Activated Enzymes to Illuminate New Microbial Ecosystems

研究代表者

吉澤 晋 (Yoshizawa, Susumu)

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・准教授

研究者番号：00553108

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：遺伝解析技術の進歩により、原核生物や真核微生物のゲノムからロドプシン遺伝子が次々と発見されており、その中に酵素型ロドプシンと呼ばれる新しいロドプシン機能が報告されている。しかしながら、海洋環境における酵素型ロドプシンの遺伝的多様性、分布、および機能制御メカニズムについては、現在のところほとんど分かっていない。本研究では、海洋真核生物を対象に酵素型ロドプシン遺伝子を網羅的に探索し、新しく見出した酵素型ロドプシンの分布や機能制御メカニズムの解析を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

非光合成または眼点を持たない真核微生物の光利用はこれまでなおざりにされてきた。しかしながら、本研究の解析から想像を超える数の酵素型ロドプシンが見つかったことで、従来は光を感知しないと考えられてきた微生物群が“光を感じ・利用している”可能性が示された。本研究で見出した酵素型ロドプシン遺伝子の分布・機能・生理的役割の詳細を解明することで、光に応じた微生物の形態・運動性・光合成効率の変化など“新たな光利用生態の概念”を創出できると考えている。

研究成果の概要（英文）：In recent years, advancements in genetic analysis technologies have led to the discovery of rhodopsin genes in the genomes of both prokaryotic and eukaryotic microorganisms. While most of these rhodopsins function as light-driven ion transporters, recent reports have identified enzyme-type rhodopsins in some eukaryotic microorganisms. These enzyme-type rhodopsins are encoded by genes that combine a rhodopsin domain and an enzyme domain into a single polypeptide, with the enzyme function being regulated by light. However, the genetic diversity, distribution, and functional mechanisms of enzyme rhodopsins in marine environments remain largely unexplored. This study aims to comprehensively search, classify, and analyze the functions of enzyme rhodopsins in marine eukaryotes, with the goal of elucidating the light-induced metabolic changes in marine microorganisms.

研究分野：微生物生態学

キーワード：海洋微生物 光受容体 メタゲノム トランスクリプトーム 微生物型ロドプシン

1. 研究開始当初の背景

微生物は“光”をどのような機構で受け取り、どのように利用しているのか？光合成は太陽光エネルギーを有機物に変換し生態系を支えている、また眼を持つ微生物は光合成を行うため、はたまた紫外線を避けるために光を感じて運動方向を変えることなどが知られている。光が微生物に与える影響はその程度なのだろうか？

これまで、光合成を行わない生物や眼点を持たない真核微生物の光利用はなおざりにされてきたと言える。また近年、数個体の微生物ゲノムから光受容体(ロドプシン)と酵素が融合したタンパク質が見つかり、光に応じて酵素活性を ON-OFF することが明らかになったことで、微生物がこれまで考えられていた以上に光を利用している可能性が示された。例えば、コナミドリムシの眼点からヒスチジンキナーゼが融合したロドプシン(HKR)や¹、真菌類に属する微生物からグアニル酸シクラーゼ(RhGC)が融合したロドプシンが見つかった。また、Brunet et al. Science 2020 では襟鞭毛中の1種を用いた研究から、酵素型ロドプシンによる光検知が微生物の群体形成に影響を与えることを報告している²。一方で、酵素型ロドプシンの機能発現メカニズムのみならず、遺伝的多様性や遺伝子を持つ系統すら分かっていない。本研究で酵素型ロドプシンの多様な微生物分類群への分布や機能が明らかになれば、光に応じた微生物の形態・運動性・光合成効率の変化など“新たな光利用生態の概念”を創出できるだけでなく、生態学や生命科学の分野に大きなインパクトを与えることが期待できる。

2. 研究の目的

本研究では、メタゲノム・トランスクリプトームの大規模情報解析、異種発現系を用いた機能解析から酵素型ロドプシンの生物学的役割を解き明かし、微生物の持つ“新しい光利用生態”の概念創出を最大の目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、“酵素型ロドプシンの生物学的役割”を解明するため、海洋真核微生物が持つロドプシン配列を網羅的に探索し、保有する分類群、機能ドメイン予測、機能解析を行うことで、微生物の世界に“新しい光利用生態”の概念創出を目指した。具体的には以下の2つの課題を遂行することで、酵素型ロドプシンの多様性と機能の解明を試みた。

1. **情報解析**：メタゲノム・トランスクリプトームの大規模情報を集約しロドプシン探索用のデータベースを作成することで、酵素型ロドプシンを網羅的に探索した。得られた配列の酵素部分の機能予測を実施した。

2. **機能解析**：目的配列を人工的に合成し、大腸菌および哺乳類細胞を用いた異種発現系を用いて機能解析を行った。実験条件は、予測された機能から実験系を構築した。また、発現に成功したロドプシンタンパク質の精製を行い、レチナル色素との結合能、吸収波長、光サイクルの測定を行った。

4. 研究成果

本研究では様々な環境のメタゲノム(73プロジェクト)、真核微生物トランスクリプトーム(The Marine Microbial Eukaryote Transcriptome Sequencing Project (MMETSP) : 650種以上の真核微生物 mRNA データを含むデータベース)及びタンパク質データベースから網羅的にロドプシン様遺伝子(アミノ酸配列が200を超えるものを対象とした)を探索した³。探索の結果、ロドプシン様遺伝子を269,361配列得ることに成功した。また、得られた配列からロドプシン以外の機能ドメインを持つ5,036配列を抽出した。その後、ロドプシン配列の詳細な系統解析および機能ドメインの機能予測を行った。データベースから取得した配列の詳細を調べた結果、ロドプシン部分および機能ドメイン部分の完全長配列を含まない配列が複数存在することが分かったため、これらの配列は以降の解析には用いなかった。また、これまでに報告のあるヒスチジンキナーゼやホスホジエステラーゼなどだけでなく、これまでに報告されていない機能ドメインを含む2736配列が得られた。得られた配列のロドプシン配列部分を抜き出し分子系統解析を行ったところ、これまでに報告されている酵素型ロドプシンは全て1つのクレードに含まれるのに対し、本研究で見出した配列は複数クレードに分かれることが分かった(図1)。このことから、微生物の持つ酵素型ロドプシンが多様な分類群に広く分布する可能性が示された。

課題1で得られた新規酵素型ロドプシン候補配列を大腸菌にコドン最適化後、人工的に合成した。合成したDNAを大腸菌に組み込み異種発現を行ったところ、全ての配列で発現が確認できなかった。温度、培養時間、転写誘導剤濃度などの培養条件の検討を実施したが、これまでに発現は確認できていない。酵素型ロドプシン遺伝子の発現が大腸菌で確認できなかったこと、酵素

型ロドプシン配列が原核生物から見つからないことから、酵素型ロドプシンは真核微生物に特化した機能タンパク質であることが考えられる。今後の研究では、ロドプシンタンパク質の膜貫通領域予測や、タンパク質が立体構造をとる際に障害となり得る領域(disorder 領域)の予測を行い、発現させるロドプシン配列について最適化を試みる予定である。

哺乳類細胞を用いた異種発現を実施した系においては、これまでに3つの候補配列(異性化酵素、アミノ基転移酵素、分解酵素)の発現が認められたが、発現時にフォールディング異常に起因すると思われる局在異常や分解がみられたため、大腸菌の系同様、発現コンストラクトの最適化を行なった。また、酵素以外の機能ドメインとして、膜輸送体と融合した新規タイプのロドプシンが見出されたため、こちらについても哺乳類細胞での発現を試みた。100以上の発現コンストラクトの最適化を経たのち、その発現系を構築することに成功した。このタンパク質について哺乳類細胞を用いて発現を行い、そのタンパク質を精製したのち、実際にレチナルの結合能や吸収波長を測定したところ、吸収スペクトルを得ることに成功している。さらに、この融合型ロドプシンのロドプシン部分を発現精製し、これを東京大学の所有するハイエンドクライオ電子顕微鏡 Talos を用いて撮影したところ、2次元クラス平均像を得るに至っている。このことから、この新規ロドプシンは3量体を形成することが示唆されている。今後、さらに解析を進めることで新しい機能ドメイン融合型ロドプシンの報告ができると考えている。

特定の真核微生物が走光性を示すことは古くから知られていたが、光の存在が細胞内の代謝に影響を与える可能性が示唆されたのはごく最近であり、酵素型ロドプシンの基礎的な知見すら現在もほとんど分かっていない。本研究で実施した網羅的な情報解析から、これまで考えられていた以上に多くの酵素型ロドプシン配列を見出すことに成功している。この成果は、従来は光を感知しないと考えられてきた微生物群が“光を感じ・利用している”可能性を示唆している。今後は、これらの遺伝子を持つ分類群や環境特異性に注目した解析を継続する予定である。また、見出した酵素型ロドプシン候補配列の配列最適化や異種発現条件を検討し、酵素型ロドプシンの機能ドメインの解析及び利用波長などを測定することで、新たな機能や細胞内での生理的役割の解明を目指したい。今後、上記の内容を解明することで、光に応じた微生物の形態・運動性・光合成効率の変化など“新たな光利用生態の概念”を創出したいと考えている。

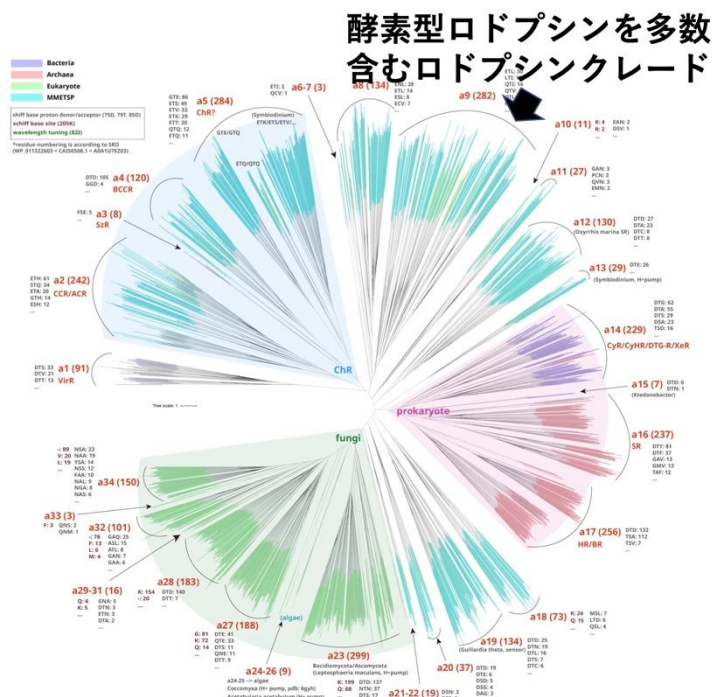


図1. 本研究で得られたロドプシン配列を含む大規模ロドプシン系統樹

引用文献

- 1 Luck, M. *et al.* A photochromic histidine kinase rhodopsin (HKR1) that is bimodally switched by ultraviolet and blue light. *J. Biol. Chem.* **287**, 40083-40090, doi:10.1074/jbc.M112.401604 (2012).
- 2 Brunet, T. *et al.* Light-regulated collective contractility in a multicellular choanoflagellate. *Science* **366**, 326-334, doi:10.1126/science.aay2346 (2019).
- 3 Keeling, P. J. *et al.* The Marine Microbial Eukaryote Transcriptome Sequencing Project

(MMETSP): Illuminating the Functional Diversity of Eukaryotic Life in the Oceans through Transcriptome Sequencing. *PLoS Biol.* **12**, e1001889, doi:10.1371/journal.pbio.1001889 (2014).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Andrew Sarah M., Moreno Carly M., Plumb Kaylie, Hassanzadeh Babak, Gomez-Consarnau Laura, Smith Stephanie N., Schofield Oscar, Yoshizawa Susumu, Fujiwara Takayoshi, Sunda William G., Hopkinson Brian M., Septer Alecia N., Marchetti Adrian	4. 巻 120
2. 論文標題 Widespread use of proton-pumping rhodopsin in Antarctic phytoplankton	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2307638120	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Yoshizawa Susumu, Azuma Tomonori, Kojima Keiichi, Inomura Keisuke, Hasegawa Masumi, Nishimura Yosuke, Kikuchi Masuzu, Armin Gabrielle, Tsukamoto Yuya, Miyashita Hideaki, Ifuku Kentaro, Yamano Takashi, Marchetti Adrian, Fukuzawa Hideya, Sudo Yuki, Kamikawa Ryoma	4. 巻 38
2. 論文標題 Light-driven Proton Pumps as a Potential Regulator for Carbon Fixation in Marine Diatoms	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Microbes and Environments	6. 最初と最後の頁 ME23015
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1264/jsme2.ME23015	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	加藤 英明 (Kato Hideaki) (80805961)	東京大学・大学院総合文化研究科・准教授 (12601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------