

令和 3 年 5 月 21 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19224

研究課題名（和文）植物プランクトンの多様な光利用戦略：ロドプシンを用いた新奇な光利用機構の探索

研究課題名（英文）Diverse photoreceptors in phytoplankton: A novel light utilization mechanism by microbial rhodopsin.

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） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：植物プランクトンは海洋の基礎生産を支える重要な光合成生物であることから、海洋生態系の理解には彼らの光エネルギー利用機構を深く知る必要がある。本研究では、クロロフィルとは異なる光受容体“ロドプシン”が植物プランクトンに広く分布すること、またその多くが光でイオンを輸送するタイプであることを明らかにした。また、モデル珪藻を用いた異種発現系から、ロドプシンが葉緑体に局在することを明らかにした。これらの結果から、植物プランクトンが保有するロドプシンは何らかの形で光合成を補助している可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

海洋の一次生産を支える植物プランクトン、彼らは光合成以外の光受容機構を持っているのだろうか？本研究では、クロロフィルとは異なる光受容体“ロドプシン”が植物プランクトンに広く分布すること、光駆動型のイオンポンプとして働くこと、葉緑体に局在することなどを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Elucidation of physiological roles of proton-pumping rhodopsin in eukaryotic phytoplankton would change our view on diversity and history of light-utilization systems on the earth, given importance of phytoplankton as primary producers. In this study, we have successfully identified more than 50 rhodopsin genes from phytoplankton and analyzed their function and spectroscopic characteristics. These results showed that the rhodopsin found in *Pseudonitzschia* (PngR) functions as a light-driven proton pump. In addition, we unveiled the intracellular localization of the PngR, with the heterologous expression system in the model diatom *Phaeodactylum tricornutum*. The results of localization analysis suggest that PngR is deeply involved in the function of photosynthesis.

研究分野：海洋微生物

キーワード：海洋微生物 微生物生態 ロドプシン 植物プランクトン 光エネルギー

## 1. 研究開始当初の背景

海洋において植物プランクトンは重要な基礎生産者であり、彼らの光エネルギー利用機構を詳しく調べることは直ちに海洋生態系の理解へと繋がる。一般的に植物プランクトンは光受容体であるクロロフィルを持ち、光エネルギーを生体内で利用可能な化学エネルギー(有機物)に変換する光合成を行う。変換された化学エネルギーは、自身のエネルギーとしてだけでなく、ほぼ全ての従属栄養性物のエネルギー源として利用される。また、植物プランクトンは光合成に関わる多様な色素を作ることが知られているが、光をエネルギーに変換する反応はクロロフィルが担っており、他の色素は光合成に直接関与しないことから一般的に補助色素と呼ばれている。一方、近年の遺伝子解析技術の発展に伴い、数多くの細菌や真核微生物ゲノムが決定され、その中から膨大な数の微生物型ロドプシン遺伝子が見つかった。微生物型ロドプシンはレチナールを発色団として持つ7回膜貫通型の光受容体で、その機能から光を化学エネルギーに変換する“イオン輸送型ロドプシン”と、光センサーとして働く“センサー型ロドプシン”の二つに大別される。しかしながら、光でイオンを能動的に輸送し膜電位に変換することでエネルギーとして利用するイオン輸送型ロドプシンは、これまで植物プランクトン(真核微生物)から見つかっていなかった。本研究では、植物プランクトンが保有するロドプシン遺伝子の配列を網羅的に解析し、見出したロドプシンの機能及び分光的特徴を調べ、最大の謎である“細胞内局在”を解明することで、植物プランクトンの新たな光エネルギー利用機構の全貌を明らかにすることを目指した。

## 2. 研究の目的

本研究では植物プランクトンの持つ“ロドプシン”が、光合成とは異なる光エネルギー受容体として機能するのかを、トランスクリプトームデータの大規模情報解析、異種発現系を用いた機能解析、蛍光融合タンパク質による細胞内局在解析を駆使することで解き明し、植物プランクトンの持つ新奇な太陽光エネルギー利用機構の存在を明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

本研究では、“光をエネルギーに変換するイオン輸送型ロドプシンが、特定の細胞小器官で機能する”と仮説を立て、3つの課題を遂行し植物プランクトンの新たな光エネルギー利用機構の全貌を明らかにする。

**情報解析:** 海洋真核微生物トランスクリプトームプロジェクト(MMETS)<sup>①</sup>からロドプシン遺伝子を網羅的に探索した。さらに機能発現に重要なアミノ酸部位の比較や、大規模な系統解析を行うことで、“イオン輸送型ロドプシン”候補の探索を行った。

**機能・分光解析:** 情報解析で得られた配列から真核藻類である珪藻 *Pseudonitzschia* の持つロドプシン配列を人工的に合成し、大腸菌を用いた異種発現系で機能解析を実施した。また、異種発現ロドプシントタンパク質をアフィニティークロマトグラフィーで精製し、分光的特徴を測定した。

**局在解析:** 合成したロドプシンと緑色蛍光タンパク質を結合させたりコンビナント遺伝子を、モデル珪藻 *Phaeodactylum tricornutum* のタンパク質発現ベクターに組み込んだ。エレクトロポレーションにより、*P. tricornutum* に形質転換した<sup>②</sup>。形質転換に成功した細胞を選抜し、緑色蛍光の局在を蛍光顕微鏡で観察した。また、細胞内の核の位置はDAPI染色をすることで確認した。

## 4. 研究成果

海洋真核微生物トランスクリプトームプロジェクト(MMETSP)からロドプシン遺伝子を網羅的に探索した結果、50以上の配列を見出すことに成功した。またイオン輸送に重要なアミノ酸部位を調べたところ、検出された多くの配列がイオン輸送機能を持つ可能性が示唆された。また系統解析の結果、真核微生物由来のロドプシン遺伝子は、バクテリアの配列中にモザイク状に配置されるのではなく、真核微生物特有のクレードを作ることが分かった(図1)。

得られた配列から珪藻 *Pseudonitzschia* のロドプシン(PngR)配列を人工的に合成し目的プラスミドに載せ替え、大腸菌に形質転換を行った。ロドプシントタンパク質の条件検討を行い、条件を最適化することで機能解析を実施した。機能解析の結果、ロドプシンを発現させた大腸菌溶液のpHが光照射で低下することが分かった。またCCCP(Carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone)を加えると、光照射してもpHが変化しないことが分かった(図2)。これらの結果から、珪藻ロドプシンは光駆動型のH<sup>+</sup>ポンプであると結論した。

異種発現ロドプシントタンパク質をアフィニティークロマトグラフィーで精製し、吸収スペクトルを測定した(図3)。その結果、珪藻 *Pseudonitzschia* が保有するPngRは、511 nmに吸収極大を持つことが分かった。この極大波長は、イオン輸送型ロドプシンでは短波長側に極大を持つ部類であり、海洋性微生物の特徴であると考えられた。PngRの光サイクルを測定した結果、61 msで初期状態に戻ることが分かった。これらの分光的特徴から、珪藻の持つPngRは海洋環境で十分活性の高い外向きH<sup>+</sup>ポンプとして働くことが示唆された。

真核微生物は原核微生物の細胞構造とは異なり、細胞内にミトコンドリアや葉緑体のような複数の細胞小器官が存在している。ロドプシンがどこに局在するかで、細胞内での生理的役割は大きく異なると考えられるため、ロドプシンに蛍光タンパク質を結合させたリコンビナント遺伝子を発現させることで局在の観察を行った。その結果、*P. tricornutum* 形質転換体の GFP 由来緑色蛍光は、細胞内に均一に観察されることなく、細胞内の一部に局在することが分かった。このことは、細胞質や細胞膜に局在しているのではなく、特定の細胞小器官に局在していることを示している。特に、緑色蛍光は、クロロフィル自家蛍光および DAPI 蛍光と共局在することが分かった。つまり、クロロフィルを含む葉緑体に局在することを強く示唆している。

珪藻は二次共生藻類であり、4重膜に囲まれた葉緑体を持っている。4重膜の、内側2枚は陸上植物や紅藻類における2重膜葉緑体と同じ由来であると考えられている。今後、さらに顕微鏡観察の解像度を上げることで、葉緑体の何番目の膜に局在するかを明らかにできると考えている。

本研究では、植物プランクトンが持つロドプシンを網羅的に探索し、少なくない種がイオン輸送型と考えられるロドプシン遺伝子を持つことが分かった。また、珪藻 *Pseudonitzschia* が保有するロドプシン (PngR) を人工的に合成し、異種発現解析を行うことで、その機能が光駆動型 H<sup>+</sup>ポンプであることを明らかにすることに成功した。また、分光解析から PngR の極大波長がクロロフィル吸収と被らない 511 nm にあることが分かった。このことは、植物プランクトンが光合成とロドプシンの二つの光捕集機構を効率よく利用している可能性を示唆している。また、リコンビナント遺伝子を用いた蛍光顕微鏡観察の結果、PngR は細胞外膜やミトコンドリアではなく葉緑体に局在することが分かった。もし ATP 合成とカップルしているなら、ミトコンドリアに局在するのが適切であると考えられるため、ロドプシンの葉緑体への局在は、光合成を何らかの形で補助する可能性を示唆している。しかしながら、二次共生藻類である珪藻の葉緑体は4重膜で構成されるため、今後『何番目の膜に局在するのか?』を明らかにすることで、植物プランクトンの持つ新たな光利用機構“ロドプシン”の生理的役割の全貌を明らかにできると考えている。

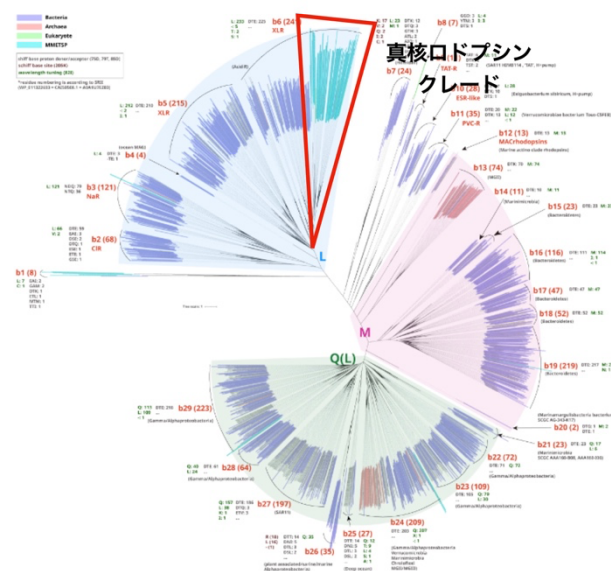


図1. 植物プランクトンが持つ真核ロドプシンを含むロドプシン系統樹

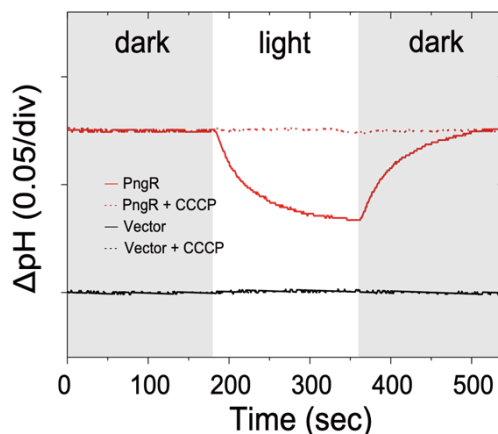


図2. PngR を発現させた大腸菌培養液に光を照射した時の pH 変化

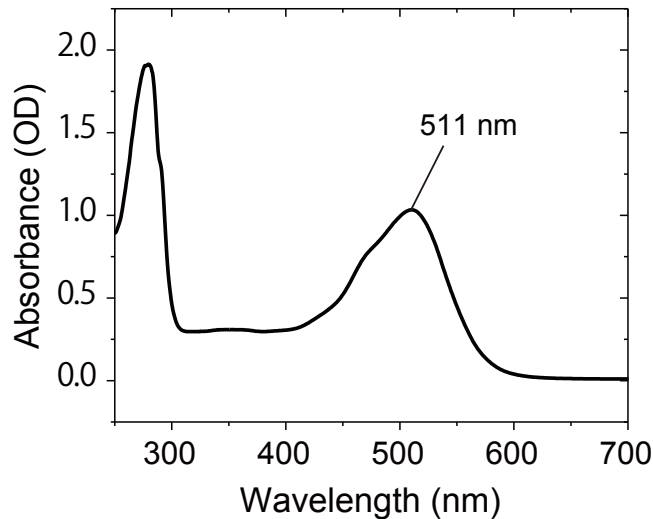


図3. 精製した異種発現 PngR の吸収スペクトル

- ① Keeling PJ, Burki F, Wilcox HM, Allam B, Allen EE, Amaral-Zettler LA, Armbrust EV, Archibald JM, Bharti AK, Bell CJ, Beszteri B, Bidle KD, Cameron CT, Campbell L, Caron DA, Cattolico RA, Collier JL, Coyne K, Davy SK, Deschamps P, Dyrman ST, Edvardsen B, Gates RD, Gobler CJ, Greenwood SJ, Guida SM, Jacobi JL, Jakobsen KS, James ER, Jenkins B, John U, Johnson MD, Juhl AR, Kamp A, Katz LA, Kiene R, Kudryavtsev A, Leander BS, Lin S, Lovejoy C, Lynn D, Marchetti A, McManus G, Nedelcu AM, Menden-Deuer S, Miceli C, Mock T, Montresor M, Moran MA, Murray S, Nadathur G, Nagai S, Ngam PB, Palenik B, Pawlowski J, Petroni G, Piganeau G, Posewitz MC, Rengefors K, Romano G, Rumpho ME, Ryneanson T, Schilling KB, Schroeder DC, Simpson AG, Slamovits CH, Smith DR, Smith GJ, Smith SR, Sosik HM, Stief P, Theriot E, Twary SN, Umale PE, Vaultot D, Wawrik B, Wheeler GL, Wilson WH, Xu Y, Zingone A, Worden AZ, 2014: “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
- ② Kamikawa R, Moog D, Zauner S, Tanifuji G, Ishida KI, Miyashita H, Mayama S, Hashimoto T, Maier UG, Archibald JM, Inagaki Y, 2017: “A non-photosynthetic diatom reveals early steps of reductive evolution in plastids”, *Mol. Biol. Evol.*, 34, 2355-66

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Needham David M., Yoshizawa Susumu, Hosaka Toshiaki, et al.	4. 巻 116
2. 論文標題 A distinct lineage of giant viruses brings a rhodopsin photosystem to unicellular marine predators	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 20574 ~ 20583
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.1907517116	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4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 長谷川万純, 西村陽介, 吉澤晋
2. 発表標題 ロドプシンから探るシアノバクテリアの多様な光利用
3. 学会等名 第32回日本微生物生態学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 仲間政樹, 小島慧一, 栗原真理恵, 吉澤晋, 須藤雄気
2. 発表標題 光駆動性アニオン輸送体(SyHR)が示す多原子アニオン輸送能と アニオン輸送能に関わる塩基性アミノ酸残基の同定
3. 学会等名 CREST 「ファイバーレス光遺伝学による高次脳機能を支える本能機能の解明」 第4回ワークショップ
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masuzu Kikuchi, Susumu Yoshizawa, Akimasa Kaneko, Keiichi Kojima, Yuki Sudo
2. 発表標題 Functional and photochemical characterization of eukaryotic H <sup>+</sup> pumping rhodopsins from the diatom <i>Pseudo-nitzschia granii</i> and dinoflagellate <i>Oxyrrhis marina</i>
3. 学会等名 第56回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yurie Nagase, Saki Inoue, Hiroshi Kuroda, Keiich Kojima, Susumu Yoshizawa, Yuichiro Takahashi, Yuki Sudo
2. 発表標題 Expression of proton pump rhodopsins in the chloroplast of the alga Chlamydomonas reinhardtii for optical control of proton gradient
3. 学会等名 第56回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2018年

〔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	神川 龍馬  (Kamikawa Ryoma)  (40627634)	京都大学・人間・環境学研究所・助教    (14301)	

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
---------	---------