

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：36301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06091

研究課題名(和文) 同生物種がもつ正と負の2つの光センサ分子の機能変換から機能の違いを生む要因を探る

研究課題名(英文) Exploration of the determinants for making different functions between positive and negative phototaxis receptor sensory rhodopsins from the same species based on their function conversion experiments

研究代表者

田母神 淳 (Tamogami, Jun)

松山大学・薬学部・准教授

研究者番号：30580089

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：高度好塩菌に存在する2つのセンサーロドプシン(SRI、SRII)は互いに異なる走光性に関与するが、その機能の違いを生む要因が何かを明らかにすることが本研究の目的である。これを達成するために、本研究では同生物種(Haloarcula vallismortis)由来でかつ安定性に優れたHvSRIとHvSRIIを用いた物性解析と機能変換実験を行った。レチナル結合部位近傍のアミノ酸残基に着目した部位特異的変異導入実験から、HvSRIIのN83残基をHvSRIと同じLeu残基に置換したとき、吸収波長と光反応がHvSRIに最も近づき、2つのSR間の違いを決める重要残基の1つであることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究より、高度好塩菌が生存に優位な光環境を求めて移動するために用いている2つのロドプシン型光受容体の性質の違いを生んでいるアミノ酸残基の1つを同定することができた。残念ながら本研究の最終目標である走光性機能の転換をもたらすアミノ酸残基の特定には至らなかったが、その候補残基の1つを見出すことができた。また、微生物由来のロドプシンは、ヒトなどの高等生物のもつロドプシンをはじめとするGタンパク質共役型受容体とは基本的には異なるものではあるが、活性化時の構造変化等では共通点も指摘されており、この研究で得られた知見は、異種タンパク質間でのシグナル伝達機構の一般的理解にも貢献するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The final goal of this study is to clarify the determinants for performing different functions between two kinds of sensor-type microbial rhodopsins, sensory rhodopsin I (SRI) and II (SRII) in haloarchaea, which are associated with opposite phototactic behaviors. In this study, we carried out photochemical characterizations and mutational analysis for their function conversion in highly stable SRI and SRII from Haloarcula vallismortis (HvSRI and HvSRII). Site-directed mutagenesis experiments in amino-acid residues located in the retinal binding site revealed that N83 in HvSRII is one of the responsible residues for making the difference between two SRs because the replacement of the residue with Leu, which is the corresponding residue in HvSRI, most significantly changed its spectroscopic properties (absorption maximum wavelength and photocycle), resulting in that these features got closer to those of HvSRI.

研究分野：生物物理化学

キーワード：微生物型ロドプシン センサーロドプシン レチナル 光受容タンパク質 走光性 シグナル伝達  
分子間相互作用 フォトサイクル

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 高度好塩菌は、自身の生存に好ましい光環境下へと移動するために、2種類のセンサータンパク質を光受容体として利用している。これらのタンパク質はいずれも発色団として all-trans 型レチナルを内包する微生物型ロドプシンであり、それぞれセンサリーロドプシン I (SRI) およびセンサリーロドプシン II (SRII) と呼ばれる。2つの SR は、それぞれの共役分子であるトランスデューサータンパク質 HtrI および HtrII と膜上に隣接して存在し、2:2 の複合体を作っている。SRI と SRII は共に光が当たると、発色団レチナルが 13-cis 型へと光異性化し、それをトリガーにタンパク質の構造変化を伴ったいくつかの中間体が形成された後、再びもとの状態へと戻るサイクリックな光反応(フォトサイクル)を引き起こす。この反応過程で、光受容体である SRI または SRII において起こった構造変化がそれぞれ HtrI、HtrII に伝えられ、それが細胞内へと伝わって、最終的に鞭毛の動きを制御することで、走性を調節している。このように SRI と SRII は、いずれも情報伝達を担う光センサーの役割をもつが、SRI が主に橙色光に寄っていく誘因応答(正)のセンサー(正確には、光反応の途中で形成される中間体に2光子目の光が当たると、忌避反応も誘起される)であるのに対し、SRII は逆に青緑色光から逃れる忌避応答(負)のセンサーとして働くといったように互いに真逆の機能をもつのが興味深い点である。しかしながら、2つの SR が共に光という共通刺激により誘起された光反応により、共役する Htr ヘシグナルを伝えるにもかかわらず、2つのケースで逆の走光性シグナル伝達が起こるのはどのような分子メカニズムによるのかという重要な問いに対しての答えはいまだ得られていない。

(2) 2つの SR の内、SRII 単体での性質や SRII/HtrII 複合体間のシグナル伝達機構についてはこれまで多くの知見が得られている。SRII の研究が進展してきた理由として、高度好塩好アルカリ性菌の一種 *Natromonas pharaonis* 由来の SRII (NpSRII) で試料を安定に得るための系が確立されていること、また NpSRII 自身が高い安定性をもっていることが挙げられる。それに対し、これまで SRI の中では唯一発現系が早い時期に確立された *Halobacterium salinarum* 由来の SRI (HsSRI) は安定性が極めて悪く、研究があまり進んでこなかった。しかし、2010年に好塩菌 *Haloarcula vallismortis* から安定な SRI (HvSRI) が発見されたという報告があった[1]。さらに、1996年の段階で同細菌内には SRII (HvSRII) の存在も示唆されていたものの、HvSRII に関する単離や発現系構築の報告例はこれまでなかったが、近年申請者らはこのタンパク質遺伝子のクローニングと大腸菌での機能的な発現に成功した[未発表データ]。さらに、予備実験の結果から、大腸菌を宿主に用いた異種発現・単離により得た HvSRII 精製タンパク質の安定性が NpSRII と同程度に高いことを見出した。これによって同じ好塩菌種に由来する2つの安定なセンサー分子を用いた機能解析を進めることが可能な状況となり、これまでなされていなかった同生物種に由来する2つの SR 分子の機能解析・機能変換実験から、SRI、SRII 間の機能メカニズムの違いを生む要因を明らかにしたいと考えた。

### 2. 研究の目的

本研究では、同生物種由来でかつ安定性に優れた2つの SR 種である HvSRI と HvSRII を実験対象に用いた物性解析と機能変換実験を行い、2つの類似する SR 同士が異なる機能を生む要因について明らかにすることを目的とする。また、その結果得られた知見をもとに、異種タンパク質間のシグナル伝達がどのような構造変化やアミノ酸を介して起こるのかを明らかにし、細胞内シグナル伝達の一般的分子機構の理解へと繋げることもねらいの1つである。

### 3. 研究の方法

(1) SRI、SRII を含めた微生物型ロドプシンの共通の性質として、可視吸収域(400~700 nm)に極大吸収波長( $\lambda_{max}$ )をもつことが挙げられる。SRI は橙色光に反応して、その光の方向に寄って行く誘因応答のセンサーであることから、 $\lambda_{max}$  は長波長側(およそ 580 nm 付近)にある。一方の SRII は、酸化的ストレスなどを避けるために、有害な光を含む短波長側の光に反応して、その光環境から逃げるように働く忌避応答のセンサーであることから、 $\lambda_{max}$  は短波長側(およそ 490-500 nm 付近)にある。このように吸収波長に大きな違いがある点が両者の間で大きく異なる特徴の1つであることから、HvSRI および HvSRII の種々のアミノ酸置換変異体を作製し、紫外可視分光光度計を用いて吸収スペクトルを測定することで、両者の間での吸収波長の違いを生んでいるアミノ酸残基の特定を行った。

(2) 微生物型ロドプシンのもつ大きな特徴の1つにフォトサイクルを示すという点がある。SRI、SRII の両者のフォトサイクルには、数 10 マイクロ秒から数 10 ミリ秒の時間領域で、発色団レチナルとオプシンとの結合部位にあたるプロトン化シッフ塩基が脱プロトン化し、短波長(<400 nm)に吸収をもつ M 中間体が形成され、その後、シッフ塩基が再プロトン化して長波長に吸収をもつ O 中間体が生成されるという特徴がある。しかしながら、SRI では、M 中間体の存在寿命が著しく長いため、その後生成される O 中間体の生成・崩壊が速度論的に検出

されないという特徴がある。したがって、両者の間でのこうした違いを指標に、HvSRI と HvSRII におけるフォトサイクルの違いを生むアミノ酸残基の同定を行うべく、HvSRI および HvSRII のさまざまなアミノ酸置換に伴うフォトサイクルの変化を閃光光分解法による光励起時の過渡吸収変化測定により調べた。

(3) SRI と HtrI または SRII と HtrII の 2 つのシグナル伝達複合体構成タンパク質のペアのどちらか一方を共発現させた高度好塩菌細胞では、それぞれの光センサーの  $\lambda_{\max}$  にあたる光を照射することで光に対する走光性応答が見られる。特に、SRII/HtrII を発現させた細胞では、光を照射した際に、細胞がスイッチバックする反転応答が見られることから、それを指標に負の走光性の有無を評価しやすい。そこで、HvSRI/HvHtrI または HvSRII/HvHtrII 複合体の好塩菌発現系の構築ならびにそれらの種々のアミノ酸残基置換に伴う光反転応答への影響を暗視野顕微鏡を用いた走光性解析システムにより観察した。

#### 4. 研究成果

(1) 上述した通り、HvSRI についてはタンパク質発現系構築ならびに分光的性質などの基本的な物性に関する先行研究[1]がすでに存在するが、HvSRII についてはいまだ報告例がないことから、まずは実験試料である HvSRII を安定に得るためのタンパク質発現系の構築と最適化を行った。微生物型ロドプシンのタンパク質発現で広く利用されている pET システムを利用した大腸菌でのタンパク質発現系を構築し、精製タンパク質試料を得たところ、1L カルチャーあたりおよそ 5 mg のタンパク質試料を得ることができ、種々の物性実験を行うのに十分な量の試料を調製する方法を確立することができた。次に、HvSRII のもつ基本的な性質を明らかにするために、分光学実験を行い、 $\lambda_{\max}$  やモル吸光係数 ( $\epsilon$ ) の算出を行った。その結果、中性の pH 条件下における  $\lambda_{\max}$  は、 $\lambda_{\max}=480$  nm と決定され (図 1)  $\epsilon$  はおよそ  $\epsilon=42,800$  M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> と見積もられた。次に、フォトサイクルおよび低塩下や光に対する安定性について調べた。HvSRII のフォトサイクルは、各中間体の生成・崩壊速度に多少の違いはあるものの既知の SRII とよく類似するものであった。また、低塩下での安定性は安定な既知の SRII である NpSRII と同様に高かった。一方で、界面活性剤ミセル中で定常光を照射時に、短波長 ( $\lambda_{\max}\approx 380$  nm) に吸収をもつ長寿命の中間体が蓄積しやすいという好塩菌 *H. salinarum* 由来の SRII (HsSRII) と共通する性質[2]も見られた。このように、HvSRII は既知の SRII として研究が進んでいる NpSRII および HsSRII の双方と共通する性質を有することが分かった。

これまでの報告で NpSRII から共役タンパク質 NpHtrII へのシグナル伝達において、2 つのアミノ酸残基である Thr204<sup>NpSRII</sup> および Tyr174<sup>NpSRII</sup> 残基が重要な役割を果たしていることが知られている[3]。一方、申請者らは最近、NpSRII の Thr204<sup>NpSRII</sup> に対応する位置が Ser 残基に置換されたタイプの SRII である HsSRII では、上記の 2 つのアミノ酸残基に対応する位置のアミノ酸残基 (Ser201<sup>HsSRII</sup> および Tyr171<sup>HsSRII</sup>) は HsSRII/HsHtrII 複合体におけるシグナル伝達には関与せず、HsSRII には NpSRII とは異なるアミノ酸残基を介したシグナル伝達機構が存在することを見出した[4]。興味深いことに今回研究対象とした HvSRII では、NpSRII の Thr204<sup>NpSRII</sup> に対応する位置のアミノ酸残基が NpSRII と同じ Thr 残基 (Thr205<sup>HvSRII</sup>) として保存されている一方、光反応の上では、上述の通り HsSRII と共通する性質も有する。したがって、NpSRII と HsSRII との間をつなぐ SRII 分子として、両 SRII の比較研究を行う上でも有益なタンパク質であり、HvSRII から HvHtrII へのシグナル伝達機構に関する研究は、今後 SRII-HtrII 間のシグナル伝達における普遍的分子機構を探る上で興味深いテーマであると考えられる。

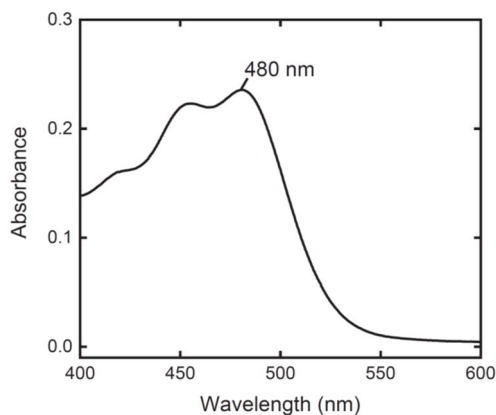


図 1 : HvSRII の吸収スペクトル

(2) HvSRI と HvSRII のそれぞれの機能に重要なアミノ酸残基を明らかにするために、さまざまなアミノ酸残基に変異を導入し、その光化学的性質に及ぼす影響について調べた。HvSRI と HvSRII のアミノ酸残基を比較したところ、双方の間で異なるアミノ酸残基は多数存在したことから、発色団レチナールの近傍に位置し、レチナール結合ポケットの形成に関与すると予想されるアミノ酸残基 (微生物型ロドプシンでは一般的にこの中に重要残基が存在するケースが多い) に絞り、両者の間で異なるアミノ酸残基を抽出したところ、6 箇所のアミノ酸残基に違いが見られたことから、HvSRII におけるそれらのアミノ酸残基を HvSRI 型に置換した単変異体 6 種 (L17F、T108M、Q105D、N83L、G130S、F134H) を作製した。6 種の変異体における吸収スペクトル測定の結果から、6 つの変異体の内、N83L のみ  $\lambda_{\max}$  が野生型と比べて、10 nm 以上大きく長波長シフト ( $\lambda_{\max}^{N83L}=493$  nm) し、HvSRI の  $\lambda_{\max}$  に近付いたことから、このアミノ酸残基が吸収波長の調節において特に重要であることが分かった。また、閃光光分解実験の結果 (図 2) から、この変異体は光反応の速さという観点からも、SRII から HtrII へのシグナル伝達時におけるシグナ

リング中間体として重要だとされている M 中間体の崩壊速度が野生型と比べて著しく遅くなり、HvSRI の性質に近くなることを発見した。したがって、この変異導入が実際に走光性機能の変換を引き起こすかどうかについては大変興味深いテーマであり、今後検討していきたいと考えている。

(3) HvSRI/HvHtrI および HvSRII/HvHtrII 複合体におけるシグナル伝達機構について解析するため、これら共役する 2 つのタンパク質遺伝子を高度好塩菌細胞に導入し、共発現させた細胞を用いた *in vivo* 解析系の確立を目指した。トランスデューサー側の 2 種の遺伝子を得るべく HvHtrI および HvHtrII の既報ならびに予測される遺伝子配列情報をもとに *H. vallismortis* のゲノム DNA からクローニングを試みたが、残念ながら目的の遺伝子断片を得るには至らなかった。一方、上述した発現系構築の試みに加え、今後、センサートランスデューサー複合体発現細胞におけるシグナリング感度について検討できるようにするために、現在保有する光応答観察のための測定系を見直し、励起光源から試料への光照射時間を調節するためのシャッターの新たな設置とその開閉時間制御のための電子回路の作製を行った。これらの改良を加えた測定系を用いて、すでに確立されている HsSRII/HsHtrII 発現好塩菌細胞において光反転応答の光照射時間変化に伴う応答細胞数の変化について調べた結果、光照射時間と応答細胞数との間にミカエリス・メンテン型の関係性が見られることが確認でき、自前の測定系でも SRII/HtrII 複合体発現細胞における光応答の光照射時間（光強度）依存性の調査を行うことが今後可能となった。

<引用文献>

- [1] Yagasaki, J. et al. Spectroscopic studies of a sensory rhodopsin I homologue from the archaeon *Haloarcula vallismortis*. *Biochemistry* **49**: 1183-1190 (2010).
- [2] Dai, G. et al. Photoreaction cycle of phoborhodopsin (sensory rhodopsin II) from *Halobacterium salinarum* expressed in *Escherichia coli*. *Photochem. Photobiol.* **86**: 571-579 (2010).
- [3] Sudo, Y. et al. Functional importance of the interhelical hydrogen bond between Thr204 and Tyr174 of sensory rhodopsin II and its alteration during the signaling process. *J. Biol. Chem.* **281**: 34239-34245 (2006).
- [4] Matsunami-Nakamura, R. et al. Key determinants for signaling in the sensory rhodopsin II/transducer complex are different between *Halobacterium salinarum* and *Natronomonas pharaonis*. *FEBS Lett.* **597**: 2334-2344 (2023).

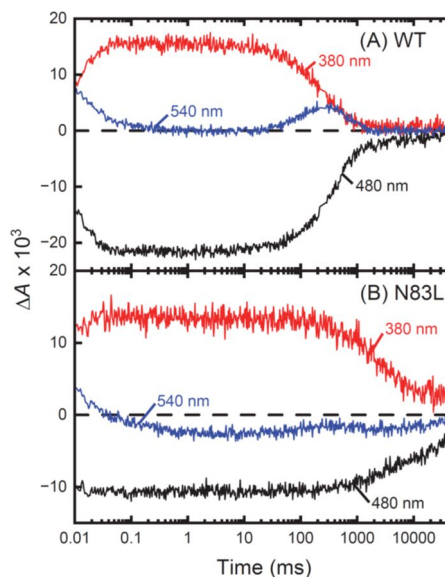


図 2: 野生型 HvSRII (A) と N83L 変異体 (B) のフォトサイクルの比較  
黒線は光励起前の HvSRII、赤線は M 中間体、青線は O 中間体の経時的濃度変化を主に反映する。

HsSRII/HsHtrII 発現好塩菌細胞において光反転応答の光照射時間変化に伴う応答細胞数の変化について調べた結果、光照射時間と応答細胞数との間にミカエリス・メンテン型の関係性が見られることが確認でき、自前の測定系でも SRII/HtrII 複合体発現細胞における光応答の光照射時間（光強度）依存性の調査を行うことが今後可能となった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 田母神淳	4. 巻 143(2)
2. 論文標題 プロトンポンプ型微生物ロドプシンのプロトン輸送機構に関する研究	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 YAKUGAKU ZASSHI	6. 最初と最後の頁 111-118
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/yakushi.22-00184	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 -
1. 著者名 Unno Masashi, Hirose Yuu, Mishima Masaki, Kikukawa Takashi, Fujisawa Tomotsumi, Iwata Tatsuya, Tamogami Jun	4. 巻 18
2. 論文標題 Spectroscopic approach for exploring structure and function of photoreceptor proteins	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biophysics and Physicobiology	6. 最初と最後の頁 127 ~ 130
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2142/biophysico.bppb-v18.014	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 -
1. 著者名 Sasaki Syogo, Tamogami Jun, Nishiya Koki, Demura Makoto, Kikukawa Takashi	4. 巻 297
2. 論文標題 Replaceability of Schiff base proton donors in light-driven proton pump rhodopsins	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 101013 ~ 101013
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2021.101013	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 -
1. 著者名 Fujisawa Tomotsumi, Nishikawa Kouhei, Tamogami Jun, Unno Masashi	4. 巻 12
2. 論文標題 Conformational Analysis of a Retinal Schiff Base Chromophore in Proteorhodopsin by Raman Optical Activity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Physical Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 9564 ~ 9568
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jpcllett.1c02552	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nishikawa Kouhei, Kuroiwa Ryosuke, Tamogami Jun, Unno Masashi, Fujisawa Tomotsumi	4. 巻 127
2. 論文標題 Raman Optical Activity of Retinal Chromophore in Sensory Rhodopsin II	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Journal of Physical Chemistry B	6. 最初と最後の頁 7244 ~ 7250
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jpcc.3c02391	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Matsunami Nakamura Risa, Tamogami Jun, Takeguchi Miki, Ishikawa Junya, Kikukawa Takashi, Kamo Naoki, Nara Toshifumi	4. 巻 597
2. 論文標題 Key determinants for signaling in the sensory rhodopsin <sc>II</sc>/transducer complex are different between <i>Halobacterium salinarum</i> and <i>Natronomonas pharaonis</i>	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 FEBS Letters	6. 最初と最後の頁 2334 ~ 2344
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1873-3468.14711	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計2件(うち招待講演 1件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 田母神淳
2. 発表標題 プロトンポンプ型微生物ロドプシンのプロトン輸送機構に関する研究
3. 学会等名 第60回 日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田母神淳、中村梨佐、西尾美紀、菊川峰志、加茂直樹、奈良敏文
2. 発表標題 高度好塩菌<i>Halobacterium salinarum</i>の光センサータンパク質センサーロドプシンIIのTyr171 Phe置換による光化学特性への影響
3. 学会等名 日本薬学会第144年会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Tamogami Jun、Kikukawa Takashi	4. 発行年 2021年
2. 出版社 IntechOpen	5. 総ページ数 35
3. 書名 Epigenetics to Optogenetics - A New Paradigm in the Study of Biology (chapter 7, title: Functional mechanism of proton pump-type rhodopsins found in various microorganisms as a potential effective tool in optogenetics)	

〔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	菊川 峰志  (Kikukawa Takashi)  (20281842)	北海道大学・先端生命科学研究院・准教授    (10101)	

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