

真核生物の起源に関わる新奇光受容型膜タンパク質ロドプシンの機能メカニズム研究

Study on the mechanism of biological function of novel photo-receptive membrane protein rhodopsins related to the origin of eukaryotes

(分子科学会推薦)

代表研究者	東京大学	井上 圭一	The University of Tokyo	Keiichi INOUE
協同研究者	東京大学	永田 崇	The University of Tokyo	Takashi NAGATA
	東京大学	八尾 寛	Tohoku University	Hiromu YAWO

In this study, we aimed to reveal the molecular functions and functional expression mechanisms of the trans membrane photoreceptive proteins heliorhodopsin (HeR) and schizorhodopsin (SzR), which were first reported in 2018 and 2019, respectively. X-ray crystallography showed that HeR forms a dimer in which two protomers are inter-connected via their long extracellular loops. A lateral hole structure in HeR to take in retinal from the outside was also found. On the other hand, SzR was found to have a light-driven inward proton pumping function, taking protons into the cell with light. X-ray crystallography also suggested that SzR has short transmembrane helices, which allow for efficient proton transport. Although SzR is evolutionarily positioned between conventional microbial rhodopsin and HeR, the protein structure is close to the former, indicating that it is a member of microbial rhodopsin and not HeR. The photo-functional mechanisms of HeR and SzR revealed in this study provide new insights into the forms of light utilization acquired by Asgardian archaea just before they evolved into eukaryotes.

研究目的

本研究では代表研究者の井上らがそれぞれ 2018 年と 2019 年に報告した光受容膜タンパク質である、ヘリオロドプシン (HeR) [1]およびシズロドプシン (SzR) [2]について、その分子機能と機能発現メカニズムの解明を目的とする。特に分光解析や X 線結晶構造解析を行うことで、構造・ダイナミクス情報を獲得し、これらの分子機能の発現メカニズムを明らかにする。特に最近の研究において、真核生物の最終共通祖先に最も近縁な現生原核生物であるとされる、アスガルドアーキア的一种であるヘイムダールアーキアが、従来の微生物ロドプシンに HeR と SzR を加えた三種類のロドプシンを持つことで、新たな光利用戦略を獲得し、真核生物への進化を果たしたと考えられることから、本研究で HeR と SzR の機能を解明することで、真核生物の起源に関わる新たな

知見が得られると期待される。

研究経過

今回、東京大学の濡木理教授らおよび名古屋工業大学・神取秀樹教授らのグループと共に HeR の光反応メカニズムを明らかにするため、X 線結晶構造解析に取り組み、その三次元構造を 2.4 Å の原子分解能で明らかにすることに成功した (Fig. 1) [3]。HeR の膜貫通領域の構造は代表的な微生物型ロドプシンであるバクテリオロドプシン (BR) と似ており、配列相同性が低いにも関わらず両者が共通した構造であることが明らかとなった。さらに、BR とよく似た形でレチナルが 7 本目の膜貫通ヘリックス (TM7) のリジンに共有結合していた。一方、細胞外ループは長く伸びたシート構造をとり、隣の分子の表面を覆うことで密な二量体を結晶構造中で形成していた。

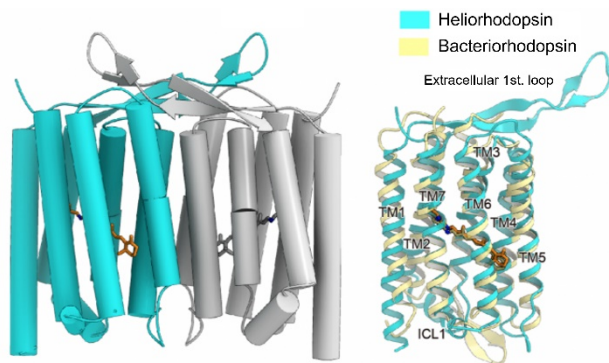


Fig. 1. The X-ray crystallographic structure of HeR

また名古屋大学・内橋貴之教授（兼・自然科学研究機構生命創成探究センター（ExCELLS）客員教授）および金沢大学・柴田幹大准教授らとの共同研究により、高速原子間力顕微鏡（AFM）観察によって、この二量体が脂質二重膜中の生理的な条件でも保たれていることを確認し、HeRは基本的に二量体として機能することを明らかとした。さらに、名古屋工業大学・神取秀樹教授らのグループとの研究において、細胞に発現させたHeRのN端、C端に異なる蛍光タグをつけることで、1細胞のイメージングを行い、実験的にHeRは通常のロドプシンと逆の膜トポロジーを持つことが示された。

一方、HeRの細胞外側は疎水的なアミノ酸残基で塞がっており、イオンや基質が通る隙間は確認されなかった。こうしたアミノ酸残基はHeRの間で保存性が高く、大部分のHeRは微生物型ロドプシンのような輸送体としては機能できないことが示唆された。一方、細胞内側はレチナールから細胞内ループにわたって、水分子を介した広範な親水性相互作用が存在しており、光受容に伴うHeRの構造変化に重要であると考えられる。

HeRの構造には、レチナールの上部に既知のロドプシンにはない、大きな横穴構造があることが明らかとなった。そして、この穴を塞ぐようにHeRのアミノ酸を変異させると、レチナールの再構成効率が大きく低下したことから、この横穴はHeRが環境中からレチナールを効率的に取り込むために重要な役割を持つと考えられる。

次に、名古屋工業大学・神取秀樹教授ら、イスラエル工科大学・Oded Béjā教授ら、チェコ科学アカデミー・Rohit Ghai教授ら、名古屋大学（兼・自然科学研究機構生命創成探究センター（ExCELLS）客員教授）・内橋貴之教授らの研究グループと共に、SzRの機能を調べるため、大腸菌やホ乳類の細胞にその遺伝子を導入し、タンパク質を大量に発現させる系を

新たに構築した。そしてその機能を解析したところ光を照射すると細胞内に水素イオン（ H^+ ）を輸送する、内向き H^+ ポンプ機能を持つことが明らかとなった（Fig. 2）。

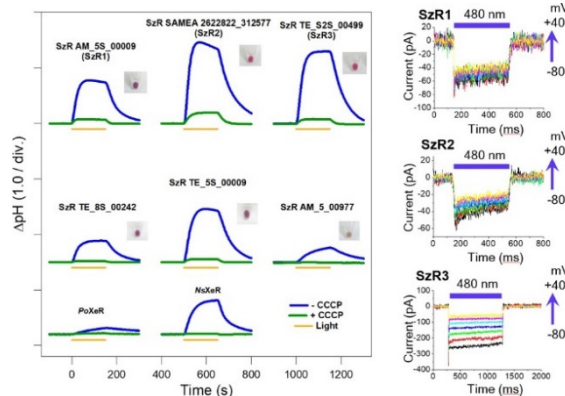


Fig. 2. Experimental results showing the inward H^+ transport of SzR studied in *E. coli* (left) and mammalian cells (right). The number of protons transported by SzRs is larger than that of another group of inward H^+ pumps (*PoXeR*, *NsXeR*) of bacteria.

この様に光で細胞内に H^+ を輸送するロドプシンは、近年深海などで見つかった、アーキアとは進化的に遠く離れた一部の細菌でのみ知られていたが[4]、この発見により真核生物に進化する直前のアスガルドアーキアも、光を使って細胞内に H^+ を取り込んでいることが初めて示唆された。またさらにSzRは海洋に広範に棲む未知の微生物グループにもあることが本研究の中で見いだされた[5]。

次に、SzRがどのようにして光エネルギーを使って、細胞内へ H^+ を運ぶのか、そのメカニズムを明らかにするために、タンパク質を精製してその性質を詳細に調べた。その結果、アスガルドアーキアのSzRは主に557 nmの光を、海洋性微生物のものは542 nmの光を吸収することが示され、棲息する環境や生物種によって利用する光の波長（色）が異なることが示唆された。またさらに分子全体の構造を高速原子間力顕微鏡で観察したところ、同一の3つの分子が集まった三量体構造を持つことが明らかとなった。

さらに、光を吸収した際にタンパク質の中で起こる反応や分子構造変化を、ナノ秒レーザーを用いた高速分光計測や高精度の赤外分光計測で解析したところ、SzRはレチナールとタンパク質内外の溶媒との間で、直接 H^+ をやり取りすることで、細胞内へ一方向的に H^+ を輸送することが明らかとなった。

さらに X 線結晶構造解析を用いて SzR の立体構造を明らかにした。SzR が既存の微生物ロドプシンと HeR どちらに近いのか調べるために、構造を比較したところ、SzR の細胞内や細胞外のループ構造は BR に近く、また BR 様の三量体を形成する一方で、HeR とは大きく異なっていた。従って、SzR はタンパク質を構成するアミノ酸の配列こそ両者の中間であるが、既存の微生物ロドプシンに分類されることがわかった。

次に、 H^+ の輸送メカニズムについて調べた。暗状態では、 H^+ はレチナールのシッフ塩基に結合しており、光刺激が入るとそこから離れて、SzR の細胞内側に存在するグルタミン酸を通して細胞内に放出される (Fig. 3)。一般的な H^+ ポンプでは、 H^+ はグルタミン酸などのアミノ酸残基や水分子の間を、玉突きのように移動していくことで輸送される。しかし SzR では、このグルタミン酸は細胞内への H^+ の輸送には必須であるにもかかわらず、 H^+ はこのアミノ酸にトラップされず、直接タンパク質から細胞の中へ放出されることが示唆されており、SzR の H^+ 輸送メカニズムには大きな謎があった。特徴的なことに、SzR の細胞内側に面している部分は他のロドプシンと比べて短く、特に TM6 は約 13 アミノ酸残基分短いものであった。こうした構造的特徴によって、細

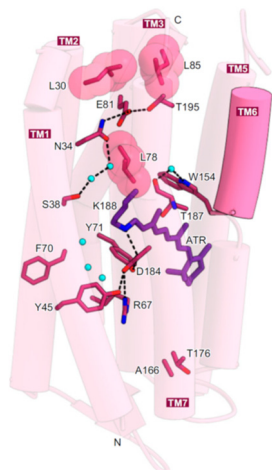


Fig. 3. Focusing on the intracellular side of the hydrogen ion transport pathway of SzR, glutamate 81 (E81) is separated from the solvent only by two leucines because TM6 is too short to cover the intracellular side like other rhodopsins. Between the Schiff base and E81, a leucine (L78) blocks the pathway, and it is thought that during photoactivation, H^+ is transferred into the cell with the rotational motion of L78.

胞内側のグルタミン酸が溶媒に露出しやすい構造を取っていることが明らかになった (Fig. 3)。水素イオンの通り道にあるアミノ酸改変体タンパク質を用いた実験によって、溶媒がタンパク質内部に流入しやすいことも示された。

こうした結果をもとに、光によって構造変化するとタンパク質内部に溶媒が入り込み、 H^+ がグルタミン酸に誘引されながら細胞の中へ直接放出されるといふ、SzR 独自の内向き H^+ 輸送モデルを提唱した。

考察

本研究は、世界で初めて HeR と SzR の立体構造を決定した。HeR は BR とはアミノ酸配列が大きく異なり、さらに膜に対する向きでも反転しているにも関わらず、構造やレチナールの結合様式に多くの類似性が見られた。しかしイオン輸送能がないことから、HeR が関与する新規の光シグナル伝達システムが存在する可能性が高く、その解明に向け今後さらなる研究が必要である。

一方、SzR の研究からはアスガルドアーキアが真核生物への進化の過程において、太陽光と酸素のある環境へ進出する際に、独自の光駆動型の内向き H^+ ポンプロドプシンを持つようになったことを示唆しており、今後は、本来のアスガルドアーキアの中で細胞の内向き H^+ 輸送がどのような役割を果たすのか、その解明に向けた研究が必要となる。

また本研究で明らかになった SzR の輸送メカニズムは、ヒトなどの体内に存在するイオン輸送タンパク質が、どのようにして輸送するイオンの種類や方向を決定するのかという、大きな問題に新たな知見を与えるものであり、他のタンパク質の分子メカニズムの理解へつながると期待される。さらに、脳の神経細胞が関連するうつ病などの発病メカニズムの研究や、血液の酸性化に伴う細胞疾患であるアシドーシスなどの機構解明に向けた分子ツールとして、SzR の医学研究への応用も期待される。

参考文献

1. Pushkarev, A. *et al.*: *Nature*, **558**, 595-599 (2018).
2. Bulzu, P. A. *et al.*: *Nat. Microbiol.*, **4**, 1129-1137 (2019).
3. Shihoya, W. *et al.*: *Nature*, **574**, 132-136 (2019).
4. Inoue, K. *et al.*: *Nat. Commun.*, **7**, 13415 (2016).
5. Inoue, K. *et al.*: *Sci. Adv.*, **6**, eaaz2441 (2020).

研究の発表

口頭発表

[受賞講演]

1. 新奇な微生物型ロドプシンの光機能およびその光反応メカニズム
○井上圭一 第3回晝間輝夫光科学賞・令和2年度研究助成金贈呈式 2021年3月18日浜松・オンライン
2. Discovery and functional analysis of novel retinal proteins
○Keiichi Inoue ミレニアムサイエンスフォーラム(サー・マーティン・ウッド賞受賞講演) 2019年11月22日 東京

[招待講演]

1. 光駆動タンパク質ロドプシンのもたらす生物と光の新たな関係
○井上圭一 日本バイオインダストリー協会・未来へのバイオ技術勉強会 2021年4月21日、オンライン
2. Photobiology of new microbial rhodopsins
○K. Inoue BPS - Biophysical Society 65th Annual Meeting February 22-26, 2021, Online
3. Sir Martin Wood Prize Lecture: The emerging world of microbial rhodopsins in photobiology
○K. Inoue MRC LMB Seminar November 26, 2020, Online
4. Sir Martin Wood Prize Lecture: The emerging world of microbial rhodopsins in photobiology
○K. Inoue MPI-FKF Seminar November 11, 2020, Online
5. 微生物ロドプシンの機能と色の制御
○井上圭一 第58回日本生物物理学会年会・シンポジウム「Biomolecular Design to Control Their Functions」2020年9月17日、オンライン
6. The diversity of photobiological functions of microbial rhodopsins
○K. Inoue 2020 World Conference on Protein Science July 6-10, 2020, Sapporo, Japan (※コロナ禍により開催中止)
7. 加速する光機能性タンパク質研究の潮流
○井上圭一 第41回光化学若手の会 2020年6月20日、京都 (※コロナ禍により開催中止)
8. Photobiology and Photochemistry of Microbial

Rhodopsins

- 井上圭一 2019年度 ExCELLS 若手リトリート 2020年2月7日、蒲郡
9. 微生物型ロドプシンの光機能とその分子メカニズム
○井上圭一 第3回先端光機能計測研究会 2019年12月26日、東京
10. Spectroscopic and structural studies on new types of rhodopsins: Heliorhodopsin and schizorhodopsin
○K. Inoue Indo-Japan workshop Frontiers in Molecular Spectroscopy_From Fundamentals to Applications in Chemistry and Biology November 1, 2019, Kobe, Japan
11. 光受容膜タンパク質微生物型ロドプシンの新地平：ヘリオロドプシンの発見と展開
○井上圭一 日本生物物理学会北海道支部講演会 2019年10月29日、札幌
12. 分子の構造とメカニズムから学ぶ、光受容膜タンパク質ロドプシンのデザイン
○井上圭一 筑波大プレ戦略研究会「生命から学ぶ」2019年10月10日、つくば
13. 急速に拡大する微生物型ロドプシンワールド
○井上圭一 第57回日本生物物理学会年会・カレントトピック・セッション「タンパク質の構造・機能・デザイン」2019年9月24日、宮崎
14. 微生物の持つ光機能性膜タンパク質ロドプシンの多様性とオプトジェネティクスの拡がり
○井上圭一 超スマート社会の構築に繋がる革新的材料創出に向けた光・量子ビーム応用技術調査専門委員会第1回委員会 2019年9月14日、大阪
15. 細菌や古細菌の持つ微生物型ロドプシンの光駆動プロトン輸送機構の多様性
○井上圭一 第92回生化学会大会 2019年9月18日、横浜
16. 光受容型膜タンパク質微生物型ロドプシンの多様な機能メカニズムと内部結合水
○井上圭一 第1回新世代研究所(ATI)水とナノ構造研究会 2019年9月10日、水上

[一般講演]

1. アスガルドアーキア由来の新奇光駆動型内向きプロトンポンプ：シズロドプシンの機能・分光・構造研究

○井上 圭一、志甫谷 渉、今野 雅恵、樋口 晶光、但馬 聖也、古谷 祐詞、川崎 佑真、永田 崇、八尾 寛、川村 出、神取 秀樹、濡木 理 第47回生体分子科学討論会 2021年6月4日、オンライン

1. アスガルド古細菌の持つ新奇光駆動型内向きプロトンポンプ、シゾロドプシンの輸送メカニズム

○井上 圭一、志甫谷 渉、今野雅恵、樋口 晶光、但馬 聖也、古谷 祐詞、川崎 佑真、永田 崇、八尾 寛、川村 出、神取 秀樹、濡木 理 日本化学会 第101春季年会 (2021)2021年3月21日、オンライン

2. 光駆動型内向き H⁺ポンプ型シゾロドプシンのH⁺輸送メカニズムの分光及び構造研究

○井上 圭一、志甫谷 渉、今野 雅恵、樋口 晶光、但馬 聖也、古谷 祐詞、川崎 佑真、永田 崇、八尾 寛、川村 出、神取秀 樹、濡木 理 日本生体エネルギー研究会第46回討論会 2020 金沢 2020年12月11日、金沢、オンライン

3. ヘリオロドプシンとシゾロドプシン：2つの新奇光受容膜タンパク質ファミリーの光反応ダイナミクス

○井上圭一、O. Béjà、神取 秀樹 第13回分子科学討論会 2019年9月17日、名古屋

4. 光エネルギーで働く微生物型ロドプシンの新世界

○井上 圭一 群馬大学理工学研究院大学院セミナー 2019年9月10日、桐生

5. 新奇ロドプシンファミリーSchizorhodopsin (SzR)による光駆動内向きプロトン輸送

○井上 圭一、角田 聡、M. Singh、今野 雅恵、富田 紗穂子、中村 良子、渡辺 大輝、内橋 貴之、R. Ghai、O. Béjà、神取秀樹 第46回生体分子科学討論会 2019年6月21日、つくば

6. *Methanoculleus* 属アーキア由来シゾロドプシンの熱安定性研究

○川崎 佑真、今野 雅恵、井上 圭一 第47回生体分子科学討論会 2021年6月4日、オンライン

7. 光駆動型内向きプロトンポンプ、シゾロドプシンのプロトン輸送メカニズム

○井上 圭一、志甫谷 渉、今野 雅恵、樋口 晶光、但馬聖也、古谷 祐詞、川崎 佑真、八尾 寛、川

村 出、神取 秀樹、濡木 理 第43回日本分子生物学会年会 2020年12月4日、オンライン

8. ヘリオロドプシンとシゾロドプシン：2つの新奇光受容膜タンパク質ファミリーの発見とその機能、光反応

○井上 圭一、O. Béjà、神取 秀樹 第42回日本分子生物学会年会 2019年12月3日、博多

9. 2つの新奇ロドプシン、ヘリオロドプシンとシゾロドプシンについて

○井上 圭一、O. Béjà、神取 秀樹 基生研研究会「異分野融合による次世代光生物学研究会」2019年11月7日、岡崎

10. Schizorhodopsin の光駆動内向きプロトン輸送とその分子メカニズム

○井上 圭一、角田 聡、M. Singh、今野雅恵、富田紗 穂子、細島 頌子、中村 良子、渡辺 大輝、内橋 貴之、R. Ghai、O. Béjà、神取 秀樹 ISSP ワークショップ「レチナルタンパク質の光機能発現の物理と化学」019年9月6日、柏

誌上発表

1. W. Shihoya, K. Inoue, M. Singh, M. Konno, S. Hososhima, K. Yamashita, K. Ikeda, A. Higuchi, T. Izume, S. Okazaki, M. Hashimoto, R. Mizutori, S. Tomida, Y. Yamauchi, R. Abe-Yoshizumi, K. Katayama, S. P. Tsunoda, M. Shibata, Y. Furutani, A. Pushkarev, O. Béjà, T. Uchihashi, H. Kandori & O. Nureki. Crystal structure of heliorhodopsin. *Nature* (2019) 574, 132-136.

2. K. Inoue, S. P. Tsunoda, M. Singh, S. Tomida, S. Hososhima, M. Konno, R. Nakamura, H. Watanabe, P. A. Bulzu, H. L. Banciu, A. Andrei, T. Uchihashi, R. Ghai, O. Béjà & H. Kandori. Schizorhodopsins: A family of rhodopsins from Asgard archaea that function as light-driven inward H⁺ pumps. *Sci. Adv.* (2020) 6, eaaz2441.

3. A. Higuchi, W. Shihoya, M. Konno, T. Ikuta, H. Kandori, K. Inoue & O. Nureki. Crystal structure of schizorhodopsin reveals mechanism of inward proton pumping. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2021) 118, e201632811.