

論文の内容の要旨

論文題目 Functional analysis of new rhodopsins present in marine bacteria
(海洋細菌が保有する新規ロドプシンの機能解析)

氏 名 中島 悠

ロドプシンはレチナール色素がその内部に結合した7回膜貫通型の光受容タンパク質である。レチナールは β カロテンから*b1h*と呼ばれる遺伝子で作る酵素によって生産され、ロドプシンと1:1で結合している。レチナールは光を受けて異性化し、ロドプシンの構造に変化を与えることで、イオン輸送やセンサーの機能を果たす。微生物型ロドプシンの最初の発見は1971年で、塩湖などに生息する好塩古細菌が持つ H^+ 輸送型ロドプシンのバクテリオロドプシン(BR)である。その後同じく好塩古細菌から Cl^- 輸送型のハロロドプシン(HR)やセンサーとして機能するセンサリーロドプシン(SR)が発見された。このことから、微生物型ロドプシンは高塩分環境に特有、と長らく考えられてきた。

近年、遺伝子解析技術の発展により、環境中の全遺伝子解析(メタゲノム)や細菌の全遺伝情報(ゲノム)が次々に解析され、そこから新たな機能遺伝子が見出されてきた。2000年に海水を対象としたメタゲノム解析により、海洋細菌が保有する H^+ 輸送型ロドプシンであるプロテオロドプシン(PR)が発見された。PRによって H^+ を膜外に排出することにより、内向きのプロトン駆動力が生まれ、これがATP合成や能動輸送などにエネルギーを供給する。このため、貧栄養海域に生息する細菌群の生理、生態に極めて大きな意味を持つと予想される。その後、海洋、淡水、土壌からもロドプシンが発見されるとともに、2013年には Na^+ 輸送型のロドプシンであるNaR、2014年には Cl^- 輸送型のClR、2016年には内向きの H^+ 輸送型ポンプであるXeRが発見され、様々な機能のロドプシンが知られるようになった。しかし、PR以外のロドプシンに関する生理的・系統的解析はまだ始まったばかりの段階である。本研究では、配列データの増加に伴い出てきた未知のロドプシンの機能、系統上の位置づけ、およびその生理的特徴を明らかにすること、さらに、レチナールの合成遺伝子(*b1h*)を持たない株を用いてその機能発揮のメカニズムを明らかにすること、さらに複数のロドプシン遺伝子を持つ株を対象にしたトランスクリプトーム解析を通じてロドプシンが光条件に応じてどのように機能しているかを明らかにすることを目的とした(付録図)。

海洋の真正細菌からは、これまで H^+ を動かすPRや Cl^- イオンを動かすClRが報告されて

きた。古細菌のバクテリオロドプシン、ハロロドプシンはH⁺ポンプやCl⁻ポンプとしてPR、ClRと同じ機能を持つが、系統的には別のクレードに属しており、その起源は別と考えられてきた。では真正細菌には古細菌型のロドプシンは存在しないのだろうか。海洋細菌 *Rubricoccus marinus* SG-29^T, *Rubrivirga marina* SAORIC-28^Tのゲノム解析により、これまでとは異なる系統的位置に海洋細菌由来の配列のみでクレードを形成するロドプシンが発見された。第2章ではこの機能未知ロドプシンのイオン輸送能およびこのロドプシンを保有する細菌の遺伝的・系統的關係を明らかにすることを目的とした。

機能未知ロドプシンの遺伝子を大腸菌内にて過剰発現させ、イオン輸送能の解析を行うとともに、ゲノム解析から得られたロドプシン遺伝子およびレチナール生産関連遺伝子の系統解析を行った。その結果、海洋細菌に見られる既知のCl⁻ポンプ (ClR) とは異なり、好塩古細菌が保有するCl⁻ポンプのハロロドプシンに近縁なCl⁻ポンプであることが明らかになった。さらに、βカロテンからレチナールを生産する**blh**遺伝子、リコペンからβカロテンを生産する**crtY**遺伝子の系統解析を行ったところ、ロドプシンだけではなく、これらの遺伝子も好塩古細菌に近縁であることが明らかとなった。これらの結果は、*R. marinus* SG-29^Tや*R. marina* SAORIC-28^Tの共通祖先がかつて高塩分環境に生息し、好塩古細菌からロドプシンなどの遺伝子を遺伝子水平伝播によって受け取った可能性を示していると考えられる。

ゲノム・メタゲノム解析は、新規ロドプシンの存在だけではなく、レチナール生産関連遺伝子についても新たな知見をもたらした。海洋に優占しているSAR86と呼ばれるグループは、PRを保有しているものの、**blh**遺伝子を持たない。同様のゲノムはデータベース上に数多く存在している。ではこれらの細菌は、どのようにレチナールを得ているのだろうか。未知の合成経路を持つのか、あるいは外部からの供給に依存するのだろうか。それ以前にイオンポンプとして実際に機能しうるのだろうか。関連する先行研究は1株、1例のみで、それによると、レチナール生産ができないため、外部からのレチナール添加によってロドプシンが初めて活性を示したとされている。しかし、その培養も1条件のみで行われており、その結果の一般化は難しい。

第3章ではこのような、「**blh**遺伝子を持たないロドプシン保有細菌」を対象とし、そのレチナール獲得方法を明らかにすることを目的とした。先行研究に使われた種の近縁種である淡水性の*Aurantimicrobium minutum* KNC^Tを用いたところ、この株は明暗いずれの条件下においてもポンプ活性を示した。また、外部からのレチナールの添加により、明条件下では活性が約3~20倍に増加した。暗条件では、活性が約1.5~2倍上昇したものの、レチナール添加時の活性の大きさは明条件と比較すると1/3~1/4であった。ロドプシンとレチナールは1:1で結合するため、次のことが示唆される。1) *A. minutum*は**blh**

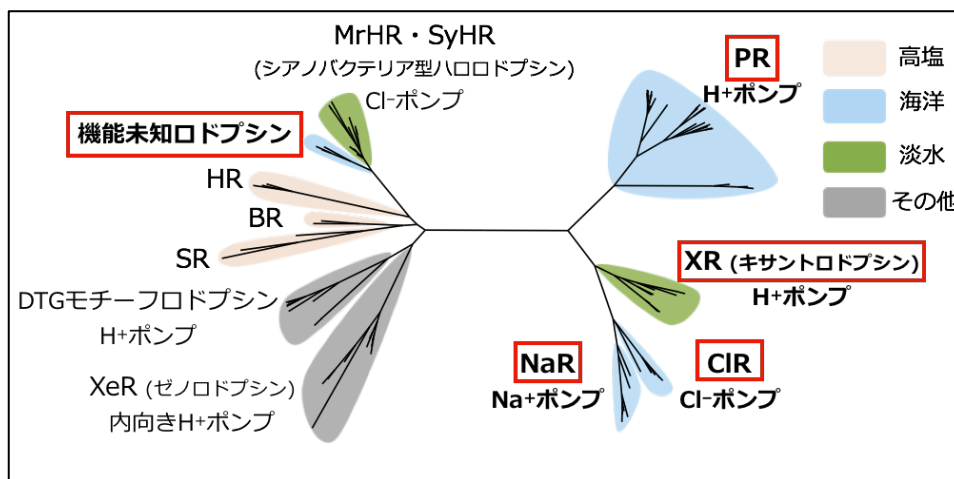
遺伝子無しでもレチナールを生産可能である。2) ロドプシタンパク質の数は明条件下で多いため、レチナール添加の効果が暗条件より大きい。3) 明条件では暗条件に比べて色素生産量が低く、レチナールと結合しているロドプシンの割合が小さい。このため、レチナール添加の効果が大きい。明条件・暗条件で培養した*A. minutum*の網羅的転写産物(トランスクリプトーム)解析を行ったところ、ロドプシンの発現が明条件で高く、レチナールの前駆体となるような色素(フィトエン・リコペン)の生産に関わる遺伝子の発現は暗条件で高い結果となった。これは上記の(2)・(3)を支持する。分光学的な色素解析を行ったところ、明条件・暗条件共にレチナールとみられる波長の吸収が検出された。これらの情報を統合し、*A. minutum*はレチナールを生産していると結論づけた。ただし、この結果は、*A. minutum*が外部のレチナールを取り込んで使う可能性を排除するものではない。今後、その生成経路について調べるとともに*blh*を持たない他の株についても同様の検討を行い、それらの株のレチナール獲得戦略を明らかにする予定である。

このように、ゲノム、メタゲノム情報に基づいて新たなロドプシンの存在が確認される一方で、それらの機能を把握し、環境中での役割を推定していくためには、実験的、生理的なアプローチが必要である。第4章では、2014年に発見された、PR, NaR, CIRを持つ海洋細菌*Nonlabens marinus* S1-08^Tを対象とし、それぞれのロドプシンがどのような条件下で用いられるのか、複数のロドプシンを持つ生理的意義は何か、を解明することを目的とし、塩分がこれらの遺伝子発現量に影響するという仮説を立て実験を行った。

海水相当の塩分および、低塩分、高塩分の貧栄養培地を調整して*N. marinus* S1-08^Tを明条件・暗条件下におき、増殖試験・網羅的転写産物(トランスクリプトーム)解析を行った。その結果、PR, NaRは暗条件に比べて明条件の発現量が常に高く、塩分ごとの比較では、海水相当よりも低塩分・高塩分の培地でその発現量が高くなった。4日目における明暗の発現量の相対比は、低塩分・高塩分条件下ではPRの発現量が4.8倍、8.3倍となり、この変化量(fold-change)は全2790遺伝子中2番目・10番目の大きさとなった。NaRの変化量は同様に2.1倍、3.8倍で、明条件でより高いものの変化量としてはPRより小さい結果となった。一方、CIRはPR, NaRに比べて発現量が低く、暗条件において発現量が高くなる条件も見られたため、PR, NaRとは発現条件が異なることが分かった。増殖試験では、最大細胞密度が明条件下で暗条件よりも常に高く、塩分毎に比較すると、低塩分・高塩分で海水相当の条件よりも高くなった。PRやNaRの発現量が高い条件と、最大細胞密度および、それらの明暗間の差が大きい条件が低塩分・高塩分の培地という点で一致した。複数のロドプシンを持つ株での発現解析としては、これが初めての知見である。しかし、その分子メカニズムについては今後の検討課題である。

本研究では、まずゲノム、メタゲノム解析からその新規ロドプシンの存在が明らかになった海洋細菌について検討を行い、海洋の真正細菌の中に古細菌型に近い新規のCl⁻ポンプがあること、さらにレチナール生産に関わる遺伝子も古細菌型に近く、遺伝子水平伝播が起こった可能性を示すと共に、*blh*遺伝子を持たない細菌株がレチナールを生産しうる可能性を初めて示すことができた。次いで、三つの異なるロドプシンを保持する株を対象に生理、生化学的な解析を行い、明暗、塩分に応じてそれぞれがどのように発現されているかを明らかにした。こうした研究結果は海洋環境中の細菌群の保有するロドプシンの生理、生態的意義に新たな知見を与えたものとする。

(付録図)



ロドプシンの系統樹および本研究での対象としたロドプシン(赤枠)