

研究 成 果 報 告 書

(国立情報学研究所の民間助成研究成果概要データベース・登録原稿)

研究テーマ (和文)	膜輸送タンパク質の光エネルギー共役を基盤とする環境浄化大腸菌の開発		
研究テーマ (英文)	Development of <i>Escherichia coli</i> for environmental remediation based on photoenergetic coupling of membrane transport proteins		
研究期間	2021 年 ~ 2023 年		研究機関名 北海道大学
研究代表者	氏名	(漢字)	菊川 峰志
		(カタカナ)	キクカワ タカシ
		(英文)	Takashi Kikukawa
	所属機関・職名		北海道大学 大学院先端生命科学研究院・准教授
共同研究者 (1 名をこえる場合は、別紙追加用紙へ)	氏名	(漢字)	
		(カタカナ)	
		(英文)	
	所属機関・職名		

概要 (600 字~800 字程度にまとめてください。)

大腸菌の細胞膜上で、2 種類のタンパク質を共役させ、環境中の毒物を細胞内へ回収させることを目指した。一方のタンパク質は、光によって活性化され、 H^+ の電気化学ポテンシャル勾配を作製する H^+ ポンプロドプシンである。もう一方は、 H^+ との対向輸送によって、様々な毒物を運ぶ多剤排出タンパク質である。これらを共役させれば、光照射下で、毒物の細胞内への蓄積が起こる可能性がある。本研究では、このような環境浄化大腸菌の開発に向けた検討を行った。

多剤排出タンパク質には NorM を使用した。バクテリア由来の 3 種の NorM 発現系を構築し、最も強い ethidium 輸送活性を示した *V. cholerae* 由来の NorM_VC を採用した。 H^+ ポンプには、強い内向き H^+ 輸送を示す *D. marmoris* 由来の Xenorhodopsin を採用し、大腸菌に NorM_VC と共発現させた。NorM_VC の輸送基質として TPP^+ を用い、その濃度変化を TPP^+ 選択電極により調べた。タンパク質を充分量発現させるため、発現プロモーター、発現誘導タイミング、発現温度の組み合わせを種々試したが、光照射による TPP^+ 輸送を観測できなかった。共発現させることで、 H^+ ポンプの発現量が著しく低下したことが原因であると考えられた。そこで、コンセプトの有効性検証のため、 H^+ ポンプと NorM_VC の精製試料を調製し、リポソームへ再構成した。 H^+ ポンプ単独では TPP^+ 輸送は起こらなかったが、両者を再構成した場合には、光照射によって TPP^+ 輸送が駆動され、リポソーム内へ 2.4 倍の濃縮が起こった。よって、大腸菌においても、十分な H^+ 勾配を形成することで毒物輸送を起こせるはずである。そのためには、NorM 合成による大腸菌への負荷の軽減が必要である。この問題は、小型の SMR 型多剤排出タンパク質などから共発現に適したタンパク質を見出すことで解決できると考えられる。

発表文献（この研究を発表した雑誌・図書について記入してください。）						
雑誌	論文課題	Reisomerization of retinal represents a molecular switch mediating Na ⁺ uptake and release by a bacterial sodium-pumping rhodopsin				
	著者名	Fujisawa, T., Kinoue, K., Seike, R., Kikukawa, T., Unno, M.	雑誌名	J. Biol. Chem.		
	ページ	102366~102366	発行年	2 0 2 2	巻号	298
雑誌	論文課題	Mutations conferring SO ₄ ²⁻ pumping ability on the cyanobacterial anion pump rhodopsin and the resultant unique features of the mutant				
	著者名	Doi, Y., Watanabe, J., Nii, R., Tsukamoto, T., Demura, M., Sudo, Y., Kikukawa, T.	雑誌名	Sci. Rep.		
	ページ	16422	発行年	2 0 2 2	巻号	12
雑誌	論文課題	Multistep conformational changes leading to the gate opening of light-driven sodium pump rhodopsin				
	著者名	Sato, Y., Hashimoto, T., Kato, K., Okamura, A., Hasegawa, K., Shinone, T., Tanaka, Y., Tanaka, Y., Tsukazaki, T., Tsukamoto, T., Demura, M., Yao, M., Kikukawa, T.	雑誌名	J. Biol. Chem.		
	ページ	105393	発行年	2 0 2 3	巻号	299

英文抄録（100語～200語程度にまとめてください。）

We aimed to drive the intracellular accumulation of environmental toxicants by energy coupling of two types of membrane proteins expressed in *Escherichia coli*. One protein is a H⁺ pump rhodopsin that is activated by light and creates an electrochemical gradient of H⁺ across the membrane. The other is a multidrug efflux protein that transports various toxicants by antiport with H⁺. Coupling of these proteins could result in intracellular accumulation of toxicants under light irradiation. In this study, we aimed to couple a H⁺ pump xenorhodopsin (XeR) and a multidrug efflux transporter NorM. However, coexpression greatly suppressed the expression level of XeR. Resultantly, light-induced transport of toxicants could not be observed even under various coexpression conditions. When these proteins were purified and incorporated into liposomes, the substrate TPP⁺ was concentrated 2.4-fold inside the liposomes under light irradiation. Thus, the elevation of XeR expression is key to drive the accumulation of toxicants in *E. coli* cells. SMR-type multidrug efflux proteins are known to have small molecular size but strong activity. Thus, the use of SMRs might reduce the stress on *E. coli* and improve the expression level of XeR.