



DOI:10.14188/j.ajsh.20240526001

微生物视紫红质的研究进展

李聪健, 张玉琴*

(中国医学科学院北京协和医学院 医药生物技术研究所, 北京 100050)

摘要: 微生物视紫红质是广泛存在于微生物中的一类光敏性膜蛋白。这类蛋白可划分为两个蛋白家族: I 型微生物视紫红质和近期发现的阳光视紫红质。两个蛋白家族的七跨膜螺旋结构相似, 但膜拓扑结构朝向相反。在光循环中, 它们通过共有的7个跨膜螺旋构象变化, 执行一系列不同的光介导的能量和信号转导过程。系统综述了微生物视紫红质的研究进展, 包括其发现、分类、结构功能、生态学意义及其在生物技术中的应用。

关键词: 微生物视紫红质; 视黄醛; 离子泵; 感光蛋白

中图分类号: Q93

文献标志码: A

文章编号: 2096-3491(2024)04-0311-13

Research progress on microbial rhodopsins

LI Congjian, ZHANG Yuqin*

(Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

Abstract: Microbial rhodopsins are photoreceptive proteins widely found in microorganisms. These proteins are categorized into two families: type I microbial rhodopsins and the recently discovered microbial heliorhodopsin. The two protein families have similar seven transmembrane helices but opposite membrane orientations. These rhodopsins participate in a portfolio of distinct light-driven energy and sensory transduction processes through conformational changes of the shared seven transmembrane helices during the similar photocycle. In this overview, we discuss the research progress of microbial rhodopsins, including the discovery, classification, structural function, and ecological roles of these two rhodopsin families.

Key words: microbial rhodopsin; retinal; ion pump; photosensor protein

0 引言

视紫红质是一类与生色基团视黄醛(retinal)共价结合的感光膜蛋白超家族。根据视紫红质的一级序列相似性, 可粗略分为3大类: (1) I 型微生物视紫红质(type I microbial rhodopsins); (2) II 型动物视紫红质(type II animal rhodopsins); (3) 微生物阳光视紫红质(microbial heliorhodopsin)。虽然序列上

相差甚远, 但是不同类型的视紫红质却有着相似的结构: 7个跨膜螺旋形成一个内部口袋, 生色基团视黄醛置于其中, 并与第七个螺旋中的赖氨酸残基的 α -氨基共价结合。这种结构上的保守和序列上的分歧特性归因于跨膜蛋白长时间分化或者趋同进化。

动物视紫红质属于G蛋白偶联受体(G protein-coupled receptors, GPCRs)家族^[1], 在动物细胞中主要负责光感知。而微生物视紫红质(包含类型I型

收稿日期: 2024-05-26 修回日期: 2024-07-15 接受日期: 2024-08-23

作者简介: 李聪健(1996-), 男, 博士生, 主要从事微生物与生化药学研究。E-mail: 1337538933@qq.com

* 通讯联系人: 张玉琴(1970-), 女, 博士, 教授, 研究方向为新微生物资源的收集和评价。E-mail: yzhang@imb.pumc.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金(32170021); 国家微生物资源平台建设(NIMR-2023-3)

引用格式: 李聪健, 张玉琴. 微生物视紫红质的研究进展[J]. 生物资源, 2024, 46(4): 311-323.

Li C J, Zhang Y Q. Research progress on microbial rhodopsins [J]. Biotic Resources, 2024, 46(4): 311-323.

微生物视紫红质和微生物阳光视紫红质)蛋白家族,广泛分布于三域生命中,同时也具有更为广泛的功能(见图1)。微生物视紫红质的生物学功能主要包含两类(见图2):(1)光能转换器(photoenergy transducers)将光能转化为电化学势能,为细胞获取能量,即光驱动离子泵,包括催化质子向外主动运输、氯向内运输和钠向外运输;(2)光感受器(photosensory receptors)利用光获取环境信息来调节细胞过程。已知的微生物视紫红质信号传导模式有与膜嵌入式转换器蛋白间的相互作用、与自身细胞质侧转换器蛋白结构域间相互作用、激活自身细胞质侧结构域编码的酶的活性以及光门控下被动离子通道的信号传导。

除了少部分特例之外^[2,3],绝大多数微生物视紫红质使用全反式视黄醛作为发色团,在光照下异构成13位顺式的构型,用于实现光循环过程(见图3)。异构化的生色基团和视蛋白间的相互作用引发整个

蛋白质的级联结构变化。随后,异构化的视黄醛可回到全反式的结构,光激活后的视紫红质也能恢复到最初的状态,这种使得视紫红质蛋白能够反复被光激活。

在20世纪70年代早期,Oesterhelt等^[4,5]发现了一种存在于盐沼盐杆菌细胞膜上的内在膜蛋白,并将视黄醛作为生色辅助因子。当时盐沼盐杆菌被归类为细菌,所以该蛋白被命名为细菌视紫红质(bacteriorhodopsin, BR)。1991年,Oesterhelt等^[6]阐明了该细菌视紫红质行使质子泵的功能,所产生的电化学势能用于ATP合成。在经历一系列详细的结构、生化和生物物理学研究后,细菌视紫红质迅速成为当时最了解的膜蛋白之一,并成为探究膜蛋白相互作用、结构和活性的模式蛋白。此外,伴随盐沼盐杆菌其他光敏蛋白相继被表征^[7],微生物视紫红质研究备受关注。在最近的半个世纪中,随着基因组和宏基因组技术的快速发展,不同功能类型微生物视

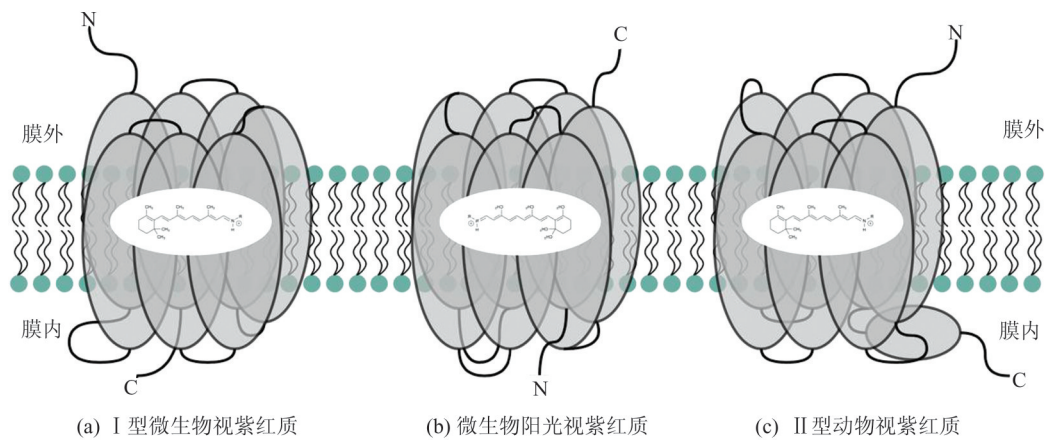


图1 已知的视紫红质类型的结构比较

Fig. 1 Structural comparison of the recognized rhodopsin types

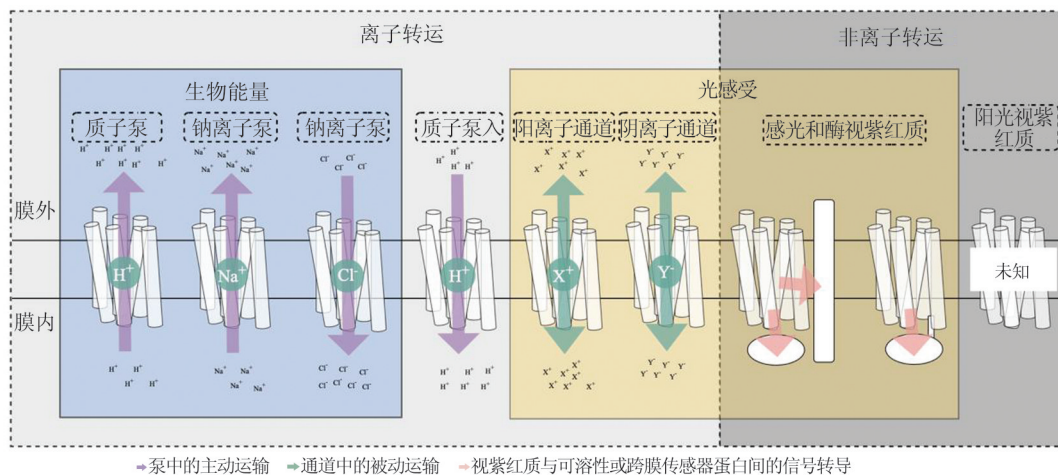


图2 微生物视紫红质的功能

Fig. 2 Functions of microbial rhodopsins

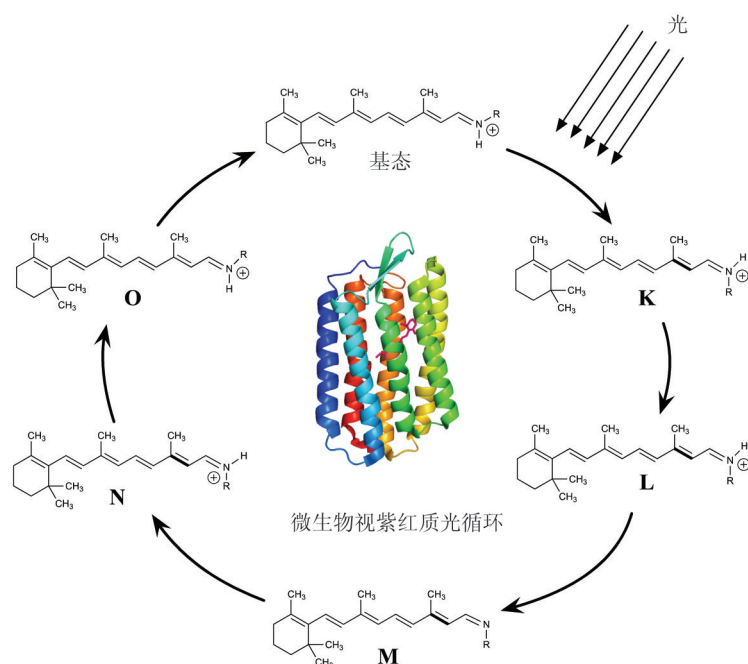


图3 微生物视紫红质驱动的光循环过程

Fig. 3 Light cycle process driven by microbial rhodopsins

紫红质在细菌、绿藻、淀粉鞭毛藻类、囊泡虫类、真菌等多种微生物中不断被发现^[1,8-10]。此外,微生物视紫红质作为操纵神经元活动和其他生理过程的光遗传学工具,已受到广泛关注,同时也将微生物视紫红质研究推向另一个高潮。本文从发现历程、分子结构、功能作用机制、生态学意义及生物技术的应用方面综述目前对于微生物视紫红质的研究进展。

1 微生物视紫红质的多样性

1.1 质子泵型视紫红质

已知最丰富和最广泛的 I 型微生物视紫红质是一类光驱动的离子泵。它通过将细胞膜内外特定离子进行矢量移位,从而将光转化为电化学膜电位,为 ATP 合成、胞内外底物转运和细胞运动等过程提供动力。

1.1.1 细菌视紫红质

20 世纪 60 年代末,有学者发现盐沼盐杆菌细胞质膜上存在一种当时未知的紫色斑块状的蛋白质色素^[11,12]。在 20 世纪 70 年代早期,Oesterhelt 等^[4]证实该紫色膜蛋白含是一种包含视黄基(retinylidene)的质子泵,并将其命名为细菌视紫红质。细菌视紫红质由一个 7 个螺旋的跨膜蛋白和共价结合可见光吸收的视黄醛组成,它通过感知光将质子泵出胞外,从而产生跨膜的电化学势能,实现 ATP 的合成。在细菌视紫红质的光循环中,不同构象的视黄醛中间体相互转换,从而将质子从细胞质向膜外方向进行转

运(见图 3)。可见吸收光谱(visible absorption spectroscopy)分析鉴定了光循环中的视紫红质具有 6 个中间态,并通过拉曼共振(Resonance Raman)和 FT-IR 光谱(FTIR spectroscopy)技术鉴定了中间态的结构特征(见图 3)。光激活下的细菌视紫红质构象从全反式(all-trans)转变为 13 位顺式结构(13-cis)。同时在 M 中间态下希夫碱(Schiff base)去质子化,而在 N 中间态下又重新质子化。结合定点诱变和光电测量分析结果,细菌视紫红质光循环中,希夫碱质子在 M 形成时转移到细胞外侧,在 M 衰变时由希夫碱从细胞质侧吸收。近年来,细菌视紫红质作为一种简单的光驱动初级转运体,因其稳定的浓缩形式适用于光学和分子光谱测量以及晶体学研究,在应用上具有重要的意义。

1.1.2 变形视紫红质

通过对太平洋沿岸水样进行宏基因组测序,人们发现了第一个细菌来源的微生物视紫红质:变形视紫红质。在对部分未培养物种进行基因组测序时,Béjā 等^[8]发现了一段来自于 γ -变形杆菌(*Gammaproteobacteria*) SAR86 的基因组片段。该片段编码了一个与古菌来源的细菌视紫红质相似性低于 30% 的类视紫红质基因。随后,在大肠杆菌的异源表达系统中,该基因被证实为视紫红质基因,且具有快速的光循环的质子泵活性。

早期的功能研究表明,SAR86 变形视紫红质在绿光范围内(520 nm)的吸光度最大,且与海洋表层

水的光合有效辐射一致^[8]。此后不久,Béjà等^[13]发现变形视紫红质的吸收光谱随着不同海洋深度的主导光谱的变化而变化(即随着深度的增加,吸收光谱从约490 nm的蓝光到约540 nm的绿光)。这表明视紫红质吸收光谱的不同是海洋微生物适应不同环境变化的重要特征之一。变形视紫红质的光谱调谐机制由视黄醛共价结合口袋上的105位氨基酸(细菌视紫红质的93位)组成决定,如亮氨酸为绿光吸收而谷氨酰胺为蓝光吸收^[14]。此外,其他氨基酸占据该位置时也能相应改变变形视紫红质的吸收光谱^[14]。

变形视紫红质是海洋微生物进行光能异养或者一种新型的光能自养生命进程的重要支持。自SAR86变形视紫红质被发现以来,从许多不同水环境(海洋、湖泊和河流)来源的细菌和古菌^[15]中鉴定出大量的同源蛋白。近期海洋环境样本的宏基因组研究表明50%~70%的海洋透光区微生物具有变形视紫红质。此外,一些对于海洋微生物的研究表明,变形视紫红质介导的光能ATP合成能够有效提升细胞在碳饥饿下的生存率^[16-19]。

1.1.3 黄紫视紫红质

2005年,有学者利用生物物理研究技术证实了极端嗜盐的红色盐地杆菌(*Salinibacter ruber*)中一个类变形视紫红质的分子,为一个特殊的视紫红质蛋白:黄紫视紫红质^[20]。与其他类型的微生物视紫红质不同的是,黄紫视紫红质利用两种不同的色素来完成光介导的质子泵功能:第一种是与其他微生物视紫红质相同并固定在蛋白内部的全反式视黄醛(all-*trans* retinal);另一种是固定在蛋白外部的天线类胡萝卜素(antenna carotenoid):Salinixanthin。后者将吸收后的光能以约40%的效能直接传递给内部的视黄醛。虽然二段传递的方式降低了能量利用率,但Salinixanthin的存在拓展了该视紫红质蛋白的最大光吸收波长范围,显著提升了光能吸收效率。

Misra等^[21]利用嗜热视紫红质(thermophilic rhodopsin)(一种来源于极端嗜热细菌的质子泵视紫红质,其本身以全反式视黄醛作为唯一的生色基团)和Salinixanthin成功在胞外合成一种新型天线复合物(antenna complex)。同时,他们发现,位于4-keto环上的保守甘氨酸残基在视紫红质与类胡萝卜素天线Salinixanthin的结合中起决定性作用。此外,NDQ钠离子泵型视紫红质同源位点上的色氨酸突变为甘氨酸后,也可以与类胡萝卜素结合^[22]。但是,其他黄紫视紫红质蛋白在这一保守位置的氨基酸残基呈现多态性:一部分是无法与类胡萝卜素结合的色氨酸,

另一部是甘氨酸^[23]。

近年来,利用基因组和宏基因组学研究手段探测到大量黄紫视紫红质基因家族存在于细菌、蓝藻、绿藻等陆地和海洋环境微生物中,尤其在真核光合浮游生物中最为常见。Strauss等^[24]从极性硅藻*Fragilariopsis cylindrus*中分离并鉴定到了一种黄紫视紫红质蛋白(FcR1)。通过生物物理、生化和遗传突变方法,他们证实了,当基于叶绿素的光合作用因铁离子浓度下降而受到限制时,黄紫视紫红质蛋白介导的光能转化维持着细胞的生长。此外,海洋表层天然硅藻群落中黄紫视紫红质基因的表达丰度与可溶性铁离子浓度呈负相关。这一结果表明,含有黄紫视紫红质蛋白的浮游微生物在铁离子浓度受限的地区具备适应性的优势。

1.2 钠离子泵视紫红质

在细菌视紫红质发现后40年内,除质子外其他阳离子泵型微生物视紫红质蛋白从未被报道。直到2013年,一个来自于海洋细菌*Dokdonia eikasta*(曾用名*Krokinobacter eikastus*)的新型视紫红质被发现,名为Krokinobacter rhodopsin 2(KR2)^[25]。通过大肠杆菌异源表达该基因,观察到光介导下的钠离子外流,从而证实KR2具备光介导下的钠离子泵的功能。进一步的功能表征研究发现,该蛋白的跨膜螺旋C上具有一个海洋真核微生物视紫红质中常见的NDQ(天冬酰胺-天冬氨酸-谷氨酰胺)保守motif结构。KR2和其同源蛋白因在跨膜螺旋C上保守的NDQ motif且具有钠离子泵活性而统称为钠离子泵型视紫红质(Na⁺-pump rhodopsin, NaR)。

系统发育分析研究表明,钠离子泵型视紫红质与质子泵型的细菌视紫红质关系密切。NaR光介导下的功能转换(在缺乏钠离子的培养基中可以行使质子泵的功能)以及相似的构象变化(跨膜螺旋F在进行光循环时进行移动而导致构象的改变)均证实了这一点^[26]。然而,NaR和细菌视紫红质的跨膜螺旋上作为光循环中的希夫碱质子转运载体的保守motif的不同,二者执行着不同的功能。KR2的112位天冬酰胺和细菌视紫红质的85位天冬氨酸是光循环中的希夫碱质子受体。细菌视紫红质的89位苏氨酸不直接参与希夫碱质子转运,而KR2中与之对应的116位天冬氨酸则参与该过程。在细菌视紫红质的光循环中,质子从希夫碱基转移到胞外的85位天冬氨酸上,而希夫碱基从胞内的96位天冬氨酸(DTD motif上的第三位的D)上获得质子实现重新质子化,从而实现质子在膜上的矢量位移(vectorial translocation)。不同的是,基于KR2的晶体衍射结

构,有学者提出了一个质子受体翻转实现钠离子转运的机制^[27]。在该模型中,离子化的116位天冬氨酸作为希夫碱的平衡离子,并在光循环中朝着希夫碱的反方向翻转,以此创造出一个钠离子转运的空间^[25,28]。

NaR分布于多种不同的革兰氏阳性和阴性细菌中。有别于质子泵型视紫红质的直接供能作用,NaR将胞内钠离子泵出,降低胞内钠离子浓度,以维持细胞稳态^[29,30]。在可培养 *Dokdonia eikasta* 中,KR2的钠离子转运与细胞生长阶段密切相关。近期分离的一株嗜盐碱异养菌株 Omega(“*Candidatus* Cyclonatronum proteinivorum”,属于 *Balneolaeota* 门的成员)能够通过 NaR 实现光介导的钠离子转运。两株同时具有钠离子泵和氯离子泵视紫红质(Chloride pump rhodopsin, CIR)的不滑动菌(*Nonlabens* sp. YIK11 和海洋不滑动菌(*Nonlabens marinus*)S1-08^T)细胞均表现出外部培养基碱化的光依赖性(目前无法确认是哪一种离子泵视紫红质主导了此种特性)^[31]。此外,虽然 *Nonlabens* sp. YIK11 中编码钠离子泵视紫红质、氯离子视紫红质和变形视紫红质的基因均上调,但是其细胞生长速率并无显著提升。然而,光照能够显著提升有着相似视紫红质基因的海洋不滑动菌的细胞生长速率^[32]。

1.3 氯离子泵视紫红质

1.3.1 TSD/TSA 型

Matsuno-Yagi 等^[33]观察到,在缺乏细菌视紫红质的盐沼盐杆菌的细胞变体中存在光诱导质子通量变化。随后,Mukohata 等^[34]证实这种活性是由一种色素引起的,并将其命名为盐视紫红质(halorhodopsin, HR)。Schobert 等^[35]通过测量光散射和细胞中光电流的离子依赖性,发现盐视紫红质是一种光介导的内向氯离子泵。HR的跨膜螺旋上具有由 TSA 组成的保守 motif。通过对陆生蓝细菌 *Mastigocladopsis repens* 中 TSD motif 视紫红质进行表征发现,一种不同类型的 CIR 存在于其基因组中。该蛋白中的 TSD motif 与嗜盐古菌中的盐视紫红质的 TSA motif 十分相似,区别仅在于前者的第三个残基为天冬氨酸(与质子泵细菌视紫红质的质子供体,即96位天冬氨酸相似)而非天冬酰胺。大肠杆菌异源表达实验发现,该视紫红质(被命名为 *M. repens* halorhodopsin (MrHR 或 MastR))具有内向泵入氯离子的功能。值得一提的是,保守 motif 上的单一位点突变导致 HR 和 MrHR 与细菌视紫红质功能互相转化(细菌视紫红质中85位天冬氨酸突变为苏氨酸时,能使细菌视紫红质转化为氯离子泵;HR 和

MrHR 中74位苏氨酸突变为天冬氨酸时,能使 HR 和 MrHR 转化为质子泵),这表明 TSD/TSA motif 的视紫红质由质子泵型视紫红质短期内进化而来^[36]。后续,学者在 *Synechocystis* sp. PCC 7509 中发现了一种新的 TSD 型视紫红质(SyHR)。SyHR 能够转运氯离子和二价的硫酸根离子。*Rubricoccus marinus* 和 *Rubrivirga marina* 基因组学研究表明,这些海洋细菌具有与 SyHR 系统发育上近缘的视紫红质^[37]。

1.3.2 NTQ 型

Yoshizawa 等^[32]首次表征了来自海洋不滑动菌 S1-08 的 NTQ motif 的 CIR。拟杆菌(*Bacteroidetes*)和 α -变形杆菌(*Alphaproteobacteria*)等多种细菌都包含相似的 NTQ 型视紫红质蛋白^[38,39],且被证实具有氯离子泵的功能。CIR 与古菌 HR 分属于不同的系统发育分支,在氯离子获取的动力学^[40]以及微生物来源(前者一般来源于海水或海洋沉积物的微生物分离物,后者则来源于高盐环境中微生物分离物)上均有不同。值得一提的是,尽管 CIR 和 NaR 的离子运输方向和电荷完全相反,但从结构和序列上,二者均具有高度相似性。CIR 在席夫碱周围的视黄醛构象不同于 HR,更接近 NaR 和 XR。组成蛋白内部口袋结构的氨基酸残基在 CIR 和 NaR 之间高度保守,并且它们之间均具有 3-omega motif 的结构。

1.4 感知视紫红质

1.4.1 感知视紫红质 I / II

众所周知,光介导的游动是可运动细菌的一种光感应答。对盐沼盐杆菌在光驱动下的应答进行研究,发现并鉴定到第一个趋光性受体,也是第一个微生物感光受体^[41,42]:感知视紫红质 I (sensory rhodopsin I, SR I)(最初被命名为慢循环视紫红质)。SR I 的与光驱动质子泵 BR 具有相同的结构框架,其光活性位点几乎与 BR 相同。但是 SR I 无法单独行使功能,而需要同与其配对的同源传感器蛋白形成一个复合体,以此完成光信号的传导。SR I 的光化学反应与已知的离子泵型细菌视紫红质和盐视紫红质有本质上的区别。离子泵型视紫红质的线性光化学反应循环十分迅速(约 10 ms),其中间产物存在时间极短。在 SR I 的单光子光化学反应循环中,蛋白质的信号传导构象会以长时间存在的光谱转移中间体的形态累积。这种信号转导构象具有光化学反应活性,并在约 70 ms 内通过第二次光激发时转换为未光解的状态。生物体通过 SR I 中的 1-光子形成和 2-光子复原的光化学反应相互作用,有效区分不同颜色光谱,从而进行趋光性的移动。SR I 分子

能够引导细胞靠近光能转化效率高的长波长光区域,远离造成光氧化损伤的近紫外波长光区域。

因在高氧浓度下(SR I 处于低水平状态)盐沼盐杆菌仍具有感光性,有学者认为该菌中存在第二种趋光性受体,通过光谱和生物化学方法表征了该新型色素,并将其命名为感知视紫红质 II (sensory rhodopsin II, SR II)(也称为趋光视紫红质)^[43,44]。SR II 及其传感器蛋白和光驱动质子泵型细菌视紫红质有着相同的光激活位点。诱变、振动光谱学和运动行为研究阐明了由传感蛋白结合导致的 SR II 结构改变。此外,在明确了 SR II 信号转导中的所有化学势能要求后,通过诱变可以将细菌视紫红质转变为更高效能的趋光性受体(比原始 SR II 效率提升约 30%)^[45]。

1.4.2 项圈藻感知视紫红质

项圈藻感知视紫红质(anabaena sensory rhodopsin, ASR)是第一个在真核微生物(蓝细菌:项圈藻)中发现的感知视紫红质^[46]。ASR 中缺乏离子泵的 motif 序列,并且同与其绑定的可溶性传感器蛋白(anabaena sensory rhodopsin transducer, ASRT)在同一操纵子进行共转录。ASR 能够在光介导下完成稳定 13-顺式和全反式视黄醛蛋白两种中间态的相互转换,其 13-顺式和全反式形式生色基团的比例取决于外界光照的波长(550 nm 转换为 13-顺式,537 nm 转换为全反式),从而感知不同颜色的光。关于 ASR-ASRT 复合体的生理功能尚未明确。有研究表明,该复合体协同调节藻胆蛋白和生物钟调节相关基因 *kaiABC* 的表达^[47]。

1.5 异视紫红质

异视紫红质(xenorhodopsins, XR)的发现始于一个对来自项圈藻感知视紫红质的诱变研究。当 ASR 的跨膜螺旋 G 细胞质一侧的 217 位天冬氨酸突变为谷氨酸时,其具有泵入质子的活性^[48]。这种离子转运机制与提供 ATP 合成和底物转运过程的离子泵(阳离子泵出或者阴离子泵入)相悖。有学者在许多原核生物上发现了一类与突变后的 ASR 相似的视紫红质蛋白,名为异视紫红质^[49]。这类蛋白具备将质子泵入胞内的活性,但其上下游均未发现与 ASR 传感器蛋白同源的基因,这意味着其生理作用与 ASR 的光信号传导不同。真正意义上的异视紫红质首次发现于太平洋深海的细菌 *Parvularcula oceani*。其基因组编码三种微生物视紫红质:假定的 NTQ 氯离子泵,NDQ 钠离子泵,异视紫红质^[50]。异源表达实验证实,*Parvularcula oceani* 中的异视紫红质具有光介导入质子的活性。随后,从西伯利

亚泰瑞尔湖(Lake Tyrrell)盐水和碱性盐水中分离的纳米嗜盐古菌(Nanohaloarchaeal)宏基因组片段中鉴定的 3 个异视紫红质和从海洋细菌海洋红球菌(*Rubricoccus marinus*)中鉴定的 1 个异视紫红质也具有泵入质子的功能。上述生物物理学研究表明,大部分异视紫红质具有光介导入质子活性。虽然目前缺乏关于异视紫红质在其原生细胞中的生理研究,但它们仍然被认为在防止细胞质碱化和调节细胞内信号传导起到了重要的作用。此外,在高盐碱湖盐水中分离的 8 株未分类嗜盐古菌(*Candidatus Nanohaloarchaea*)的草图基因组中,有 6 个含有异视紫红质基因。这表明在高盐和碱性环境中定殖的物种具有丰富的泵入质子活性的相关基因^[51]。

近年来,另一类重要的内向质子泵视紫红质——Schizorhodopsin 在古菌中被发现,其跨膜螺旋 C 的序列与反向膜拓扑结构的阳光视紫红质有着高的相似性^[52]。

1.6 通道视紫红质

1.6.1 阳离子通道型视紫红质

绿藻中的衣藻(*Chlamydomonas*)细胞具有趋光性,能够通过改变鞭毛(Flagella)和眼斑(Eyespot)的内向光电流来挥动鞭毛,从而将自己移动到最适光照强度的位置^[53]。其中,内向光电流的调节是由一种未知类型的视紫红质(发现趋光性时)所介导的。绿藻眼斑上的内向光电流主要由钙离子和质子所携带。克莱米多蒙酸菌(*Chlamydomonas reinhardtii*)中的光电流几乎在光照的一瞬间便产生了,而在缺乏钙离子时消失。cDNA 文库分析鉴定了几个类微生物视紫红质基因存在于克莱米多蒙酸菌中。电生理学测量分析验证了其中两个是光介导的阳离子通道蛋白,并分别命名为通道视紫红质 1(channelrhodopsins1, ChR1)和通道视紫红质 2(channelrhodopsins2, ChR2)^[54,55]。此类阳离子通道视紫红质的同源物在很多不同的绿藻中均有分布^[56-58]。

1.6.2 阴离子通道型视紫红质

除绿藻外,在隐藻中也观察到追踪光线方向的能力,因此它们的基因组似乎同样含有编码类通道视紫红质蛋白质的基因。然而,在隐藻中发现的与绿藻阳离子通道型视紫红质最接近的同源物被证明是光门控阴离子通道视紫红质(其阴离子为氯离子)。利用宏基因组分析方法在 *Sagenista*(一类无光合作用的不等鞭毛类生物)中发现了两个不同家族的阴离子通道视紫红质(anion channelrhodopsin, ACR): MerMAID 和 Labyrinthulea 通道视紫红

质^[59]。MerMAID在宏基因组数据集中被发现,并证实具有快速脱敏的光循环,这一特性使其具备作为高精度抑制的光遗传学工具的潜能。Labyrinthula通道视紫红质具有广泛的光吸收谱,其中,Ruby-ACRs的吸收光谱范围为590~610 nm(红光)。在可移动的藻类中还发现了两个不同的ACR家族:来自定鞭藻(*Haptophyte*)的定鞭藻阴离子通道视紫红质^[60]和来自可移动绿藻的绿藻阴离子通道视紫红质^[57]。值得一提的是,这些不同的通道视紫红质家族仅分布在可移动的且具有眼斑的物种中,这表明阴离子和阳离子通道视紫红质在藻类中行使调节趋光性的功能^[57]。

1.7 酶视紫红质

所有原核生物的视紫红质都是单独或与同源的传感器蛋白形成复合物发挥作用。但是一些真核微生物视紫红质被发现可融入其他的功能结构域,如组氨酸激酶、鸟苷酸环化酶、磷酸二酯酶的结构域^[61]。这一类视紫红质统称为酶视紫红质。

1.7.1 组氨酸激酶视紫红质

第一个酶视紫红质家族被发现存在于克莱米多蒙酸菌中,且具有组氨酸激酶结构域的组氨酸激酶视紫红质^[62]。克莱米多蒙酸菌基因组中包含8个组氨酸激酶视紫红质基因,其中部分在C末端具有核苷环化酶结构域。随后实验证实了其中一个克莱米多蒙酸菌的酶视紫红质蛋白和其来自*Volvox carteri*的同源物均具有鸟苷酸环化酶的活性。在无光照时,组氨酸激酶磷酸化,从而激活核酸环化酶。而在有光照时,激活的视紫红质会抑制上述的级联反应^[63]。酶视紫红质的光反应循环与其他微生物视紫红质的区别在于希夫碱的质子化态和光循环中顺式和反式的转换^[3,64]。目前组氨酸视紫红质在细胞中的生理作用尚未明确,仅存在一些相关推论。例如,组氨酸视紫红质基因的表达量在*Volvox carteri*性周期诱导下的快速上升,表明其与性发育有关^[65];球形绿藻(coccal green alga) *Ostreococcus tauri*的组氨酸视紫红质被认为参与调节生物钟的双组分系统^[66]。

1.7.2 鸟苷酸环化酶视紫红质

鸟苷酸环化酶视紫红质(rhodopsin guanylyl cyclases, Rh-GC)被发现存在于水生胚壳真菌(aquatic blastoclad fungus) *Blastocladiella emersonii*。Rh-GC由一个视紫红质结构域和一个与其C末端连接的鸟苷酸环化酶结构域组成。Rh-GC通过提高cGMP的水平,在*Blastocladiella emersonii*中发挥着绿光传感器的作用^[67]。有研究表明,Rh-GC在*Blastocla-*

*diella emersonii*中有着较高的活性水平,且在有无光照条件下有极高的活性差异。游动孢子真菌(*Alloomyces macrogynus*和*Catenaria anguillulae*)中也存在鸟苷酸环化酶视紫红质的同源蛋白^[67,68]。此外,在*Rhizoclostridium globosum*中发现了3个不同的Rh-GC。其中,两个吸收蓝光和绿光的Rh-GC与另一个红光吸收的Rh-GC能够进行异源二聚化^[69]。

1.7.3 磷酸二酯酶视紫红质

磷酸二酯酶视紫红质(phosphodiesterase rhodopsin, Rh-PDE)首次发现于领鞭虫(Choanoflagellate) *Salpingoeca rosetta*^[70]。其磷酸二酯酶结构域与视紫红质结构域在C末端连接。虽然*Salpingoeca rosetta*的Rh-PDE(*SrRh-PDE*)在黑暗中也具备磷酸二酯酶活性,但在蓝光照射下,酶活性能够得到显著增强^[70]。同时*SrRh-PDE*催化cGMP的磷酸二酯酶活性是cAMP的5~10倍。

1.8 阳光视紫红质

2018年之前,人们普遍认为视紫红质只存在两种类型:I型微生物视紫红质和II型动物视紫红质。因此,利用宏基因组技术发掘出的新型阳光视紫红质被报道时引发了空前的热议^[71]。

阳光视紫红质与I型微生物视紫红质之间存在几个重要的特征差异。首先最大的区别在于倒置的膜拓扑结构。在阳光视紫红质中,第七个穿膜螺旋结构域是碳末端朝向胞外而非动物视紫红质和I型微生物视紫红质中的氮末端朝向胞外(见图1)。这种反向的拓扑结构在视紫红质乃至所有的7穿膜螺旋受体蛋白中都是罕见的。第二个特征便是阳光视紫红质在跨膜螺旋A和B的胞外部分之间存在一个长的 β -折叠环,该结构有助于稳定阳光视紫红质二聚体。第三个是阳光视紫红质具有独特的光谱转移机制^[72]。最后是阳光视紫红质与I型微生物视紫红质序列间存在较低的同源性(序列相似性低于15%)。然而,不置可否的是,阳光视紫红质与I型微生物视紫红质之间也存在许多相似之处,其中包括在螺旋G上的保守赖氨酸残基共价结合的全反式视黄醛生色基团、谷氨酸作为希夫碱的平衡离子以及跨膜螺旋C上的保守精氨酸位点^[73,74]。

阳光视紫红质的功能尚未明确。其缺乏离子运输活性,有着缓慢的光循环过程,也无法鉴定到类似感知视紫红质中的传感器结构域或传感器蛋白基因。关于阳光视紫红质的功能,研究人员提出了许多假设,如双亲分子的转运、二氧化碳的固定、影响生物体中的信号转导、与操纵子中的邻近基因相互作用以及通过融合酶的结构域而表现酶活性

等^[75,76]。然而,这些假设均未进行实验验证。

阳光视紫红质的分布十分特殊,它主要分布在没有外膜的生物中,如真核微生物、古菌、单膜细菌(革兰氏阳性)、大型真核病毒^[77],以及部分外膜上没有脂多糖的可培养双膜细菌(革兰氏阴性),如棒状杆菌目(*Corynebacteriales*)和 *Thermocalda* 超门中的物种。此外,具有阳光视紫红质的微生物来源丰富,包括来自土壤、淡水、海洋和高盐环境的嗜冷菌、常温菌,甚至超嗜热菌。

2 微生物视紫红质在光遗传学中的应用

光遗传学是一项整合了光学、基因工程以及电生理学等多学科的新兴生物技术。通过遗传表达的光反应蛋白,光遗传学技术能够实现对活细胞或生命体内的特定生物反应的程序性调控。相较于传统的化学物质的调节和直接的电信号刺激,光遗传学技术中的光信号在有着更高的空间和时间上的精度的同时,也降低了对活体细胞的损伤。正因如此,该项技术被广泛应用于生命科学基础研究中,如神经生物学、细胞生物学以及分子生物学。作为第一个被用于光遗传学元件蛋白的微生物视紫红质,因分布广泛且功能多样化,一直备受瞩目。除此之外,因为天然存在全反式视黄醛的 I 型微生物视紫红质介导的离子流动能够直接调节神经元活动以及完成全部的光化学反应。所以,最初光遗传学中涉及的感光蛋白被限定在该类视紫红质中。而后,随着技术的不断发展,尤其是光遗传学中的基因工程技术的优化,许多不同类型功能的微生物视紫红质被成功应用于光遗传技术中,以期在靶向细胞中实现不同的功能。

2.1 神经元活动调控

2.1.1 神经元激活

在 2002 和 2003 年, Nagel 等^[54,55]在单细胞绿藻细胞中发现了两个离子通道型视紫红质(ChR1, ChR2),并进行了功能表征。随后, Boyden 等^[78]成功在大鼠的海马神经元细胞中表达了 ChR2 蛋白,并通过膜去极化诱导了光依赖性神经激活。自此之后, ChR1 和 ChR2(主要是 ChR2)通过病毒载体转染到各种神经元细胞中(如海马神经元、视网膜神经元、多巴胺神经元和皮质神经元),以实现瞬时表达和小鼠转基因细胞系的生成。然后,通过研究光调控的神经元活动来阐明其在脑组织切片或活体动物上的功能以及神经回路。此外,除了 ChR1 和 ChR2 外,其他自然的阳离子通道视紫红质及其遗传改造产物被相继用于神经元激活相关研究中^[79]。比如

C. noctigama 和 *Tetraselmis striata* 中的阳离子通道蛋白(分别命名为 Chrimson 和 TsChR)分别吸收红光和绿光,用于红蓝光神经激活器;分离自 *Stigeoclonium helveticum* 的通道视紫红质——Chronos 具有快速响应的离子通道关闭特征,用于高频神经激活器;ChR2 的突变型 C128T 具有缓慢响应的离子通道关闭特征,被应用于长时间的神经激活器。神经学家们可以利用上述天然或后天改造的分子在广色域和长时间跨度范围内精确调控神经元活动。

2.1.2 神经元沉默

2007 年,来源于古菌 *Natronomonas pharaonis* 的视紫红质(NpHR)被证实可以通过其内向氯离子转运诱导小鼠海马神经元的膜电位超极化,从而抑制神经元的活动(神经元沉默)^[80]。NpHR 基因经过几种不同的修饰改造(如膜运输信号、ER 泵出信号),以提高其在细胞膜中的表达水平和靶向定位精度,从而增强其神经元沉默的活性。NpHR 作为首个神经元沉默器,用以调节各种神经元(如海马神经元、胆碱能神经元、多巴胺能神经元和初级躯体感觉皮层)在脑切片和活体动物中的活动。此外,Archaeorhodopsin-3、其同源物以及其他的质子泵型视紫红质均被证实能够介导神经元沉默^[81]。由于 Archaeorhodopsin-3 在细胞膜中具备表达量高、定位精准以及光电流通量比 NpHR 及其他质子泵视紫红质更大等特征,因此被广泛用作模式的神经沉默工具,来调节多种神经元的活动。

除离子泵型视紫红质蛋白外,隐藻中的阴离子通道视紫红质 ACR-1 和 ACR-2 也被证实通过向内转运阴离子(主要为氯离子)介导哺乳动物神经元细胞膜超极化,而实现神经元沉默^[82]。传统的质子泵型视紫红质(NpHR 和 Archaeorhodopsin-3)在每个光循环中仅传输一个离子。然而,阴离子通道视紫红质(ACR-1 和 ACR-2)在每个光循环中传输数千个离子,进而产生高通量的光电流。因此,ACR-1 和 ACR-2 被开发为强神经元沉默制剂,其在动物神经元细胞中诱导产生的光电流约为 Archaeorhodopsin-3 的 1 000 倍。此后,相关研究发现了大量天然阴离子通道视紫红质或其他基因改造产物(如红蓝光吸收、快速和慢速通道关闭)。这些天然或非天然感光蛋白分子进一步提升了光遗传学技术中神经元活动抑制的吸收光色域和时间跨度范围。实际上,阴离子视紫红质蛋白作为高效的神经抑制剂,被用于各种组织切片甚至活体动物中调节神经元活动。现如今,ACR 已逐步取代 NpHR 和 AR3,成为新一代的神经抑制剂。

2.1.3 电压成像

Archaerhodopsin-3 在红光(约 560~620 nm)的激发下会产生近红外荧光(约 660~760 nm)。这种荧光被认为源自光循环过程中一个高度荧光的 Q 中间体,其强度与膜内电压高度相关。因此 Archaerhodopsin-3 可以检测到传统电压指示器如 Ca^{2+} 传感器无法检测到的 $-150\sim 150\text{ mV}$ 的绝对膜电压变化^[83]。除此之外,Archaerhodopsin-3 在电压成像方面还具备两个优势:(1)通过基因工程技术在神经元细胞中直接表达;(2)快速响应($500\ \mu\text{s}\sim 40\text{ ms}$)。然而,天然的 Archaerhodopsin-3 在红光激发状态下,仍然参与光诱导的质子泵运输,以致膜超极化,进而对电压成像信号产生干扰。近年来,通过随机诱变和定向进化方法,诱导天然的 Archaerhodopsin-3 的 Asp85 残基突变,消除了其光诱导质子泵活性,从而可以追踪真实的电压变化。这些基因工程产物表现出更高的荧光、信噪比水平和更准确的膜定位^[84]。因此,基于基因工程改造的 Archaerhodopsin-3 电压指示器(如 QuasAr2、QuasAr3、Archon-1 和 Archon-2)已被用于组织切片和活体动物中进行实时成像。

2.2 基因表达调控

离子浓度不仅参与神经活动,也参与非神经活动。如上所述,微生物视紫红质主要是光介导下参与各种离子主动运输并与各种信号转导分子相互作用的一类代表性的分子。在 2022 年的研究中,微生物视紫红质主要应用于控制神经活动。直到 Irieda 等^[47]发现,ASR 在大肠杆菌细胞中异源表达时,能够在光介导下抑制色素适应基因 *cpcB* 的转录。除了 *cpcB* 基因外,ASR 可以作为光介导制剂来调节细胞中任意蛋白质的表达。

3 结论

本文首先简要叙述了近 50 年来微生物视紫红质的发现历史、分子功能,以及一些独特性如何推动了研究者对光生物化学和光生物学的理解;其次,从神经与非神经元活动两个方面探讨了目前微生物视紫红质在光遗传学技术中的应用。

自微生物视紫红质被发现以来的 50 年间,关于其结构、功能及应用的研究热度一直居高不下。大量新型视紫红质的发现,极大拓展了人们对微生物在不同生态系统中的功能认知。少部分通过模式生物中的感光蛋白研究获得(如克萊米多蒙酸菌通道视紫红质蛋白),大多数基于已知视紫红质序列,通过生物信息学手段从培养菌株的基因组或未培养菌株的宏基因组中获得(如 NDQ 钠离子泵视紫红质和

变形视紫红质)。然而,近期一项基于蛋白活性(目前主要为光介导的质子泵活性)而非序列同源性的功能宏基因组技术被应用于海洋微生物视紫红质基因的鉴定,并发现了大量的变形视紫红质基因和一种新型放线菌视紫红质^[85]。此外,该项技术在一类与其他视紫红质的同源性较低的阳光视紫红质的发现上起到了决定性作用^[71]。因此,功能宏基因组技术的应用会给未来视紫红质基因筛选研究带来更多新的发现。另一个新型视紫红质挖掘的方向便是从尚未涉及的具有独特光照条件的非水生环境或强酸强碱的环境样本中挖掘。

纵观微生物视紫红质研究历史,其前期报道主要集中在具有独特光照的水生环境中,如海洋、冰川、淡水湖泊、高盐湖泊乃至冻土层。而鲜有关于非水生环境来源的视紫红质的报道。虽然,通过分子生物学手段从陆生植物叶际、土壤结皮和南极干谷土壤样品中检测到了微生物视紫红质基因^[86,87],但从纯培养物中检测到微生物视紫红质的例证还局限在水环境来源的微生物中。直到 2020 年,Tarlachkov 等^[30]报道以沙漠等干旱环境为主要栖息地的嗜皮菌科放线菌的多数菌株(约 88%)中含有 DTE 和 NDQ 型视紫红质。此外,基于保守位点的比对结果表明,一类新型的微生物视紫红质 DTEF 仅分布在地嗜皮菌科放线菌中。然而其结构、功能机制及在沙漠这类极端环境中生理生态功能均未明确。这类蛋白属于 DTE 型视紫红质的亚型,其可能也具备质子泵活性。与一些海洋微生物中的变形视紫红质一样,先锋生物地嗜皮菌科放线菌通过新型视紫红质 DTEF 进行光介导的光能 ATP 合成,进而提升细胞在碳饥饿下的生存率,以适应沙漠干旱带来的营养缺失。

微生物视紫红质是一类以视黄醛作为生色集团的跨膜感光蛋白,广泛分布于原核和真核微生物中。这类 7- α 螺旋跨膜蛋白能够在光照条件下诱导视黄醛异构化。受光激发后,视黄醛经历了由暗适应向光适应的转换后进入光循环,其构型转变促使蛋白分子的结构发生一系列动态构象变化后回到基态,完成离子转运或信号传导。这种时间和空间上精确的光刺激和自身携带感光生色基团的特性对理解膜蛋白结构功能、光化学、生物能学、感知信号传导、蛋白进化以及生物与光之间相互作用模式的多样性作出了突出性贡献。而其中最重要的便是在光遗传学技术中的广泛应用。在光遗传技术中,微生物视紫红质的光化学反应可以实现对跨膜离子电流的时间和空间上的精确控制,从而调节神经元的动作电位。

这项新技术引领了果蝇、蠕虫、啮齿动物和其他模式动物的神经回路研究新方向,并大幅度加快了大脑功能研究的步伐。此外,光遗传学技术能够在不影响其他神经元的情况下控制特定的目标神经元群体。因此光遗传学技术的基因治疗是一种比药物或电植入更精确、损伤更小的神经和心脏相关疾病治疗策略^[88],如利用阳离子通道视紫红质来恢复视网膜退行性疾病患者的视力。同时,通过天然筛选和人工诱变,获得了灵敏度更高、反应速度更快、开启时间更长以及蓝光和红光吸收的各种新型的光门控阳离子通道视紫红质蛋白^[89-92]。

参考文献

- [1] Spudich J L, Yang C S, Jung K H, *et al.* Retinylidene proteins: structures and functions from Archaea to humans[J]. *Annual Review of Cell & Developmental Biology*, 2000, 16: 365-392.
- [2] Sudo Y, Ihara K, Kobayashi S, *et al.* A microbial rhodopsin with a unique retinal composition shows both sensory rhodopsin II and bacteriorhodopsin-like properties [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2011, 286(8): 5967-5976.
- [3] Luck M, Hegemann P. The two parallel photocycles of the *Chlamydomonas* sensory photoreceptor histidine kinase rhodopsin 1[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2017, 217: 77-84.
- [4] Oesterhelt D, Stoerkenius W. Rhodopsin-like protein from the purple membrane of *Halobacterium halobium* [J]. *Nature New Biology*, 1971, 233(39): 149-152.
- [5] Oesterhelt D, Hess B. Reversible photolysis of the purple complex in the purple membrane of *Halobacterium halobium*[J]. *European Journal of Biochemistry*, 1973, 37(2): 316-326.
- [6] Oesterhelt D, Bräuchle C, Hampp N. Bacteriorhodopsin: a biological material for information processing[J]. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 1991, 24(4): 425-478.
- [7] Oesterhelt D. The structure and mechanism of the family of retinal proteins from halophilic Archaea[J]. *Current Opinion in Structural Biology*, 1998, 8(4): 489-500.
- [8] Bějá O, Aravind L, Koonin E V, *et al.* Bacterial rhodopsin: evidence for a new type of phototrophy in the sea [J]. *Science*, 2000, 289(5486): 1902-1906.
- [9] Brown L S. Fungal rhodopsins and opsin-related proteins: eukaryotic homologues of bacteriorhodopsin with unknown functions[J]. *Photochem Photobiol Sci*, 2004, 3(6): 555-565.
- [10] Broser M. Far-red absorbing rhodopsins, insights from heterodimeric rhodopsin-cyclases[J]. *Front Mol Biosci*, 2022, 8: 806922.
- [11] Stoerkenius W, Rowen R. A morphological study of *Halobacterium halobium* and its lysis in media of low salt concentration[J]. *J Cell Biol*, 1967, 34(1):365-393.
- [12] Stoerkenius W, Kunau W H. Further characterization of particulate fractions from lysed cell envelopes of *Halobacterium halobium* and isolation of gas vacuole membranes[J]. *J Cell Biol*, 1968, 38(2):337-357.
- [13] Bějá O, Spudich E N, Spudich J L, *et al.* Proteorhodopsin phototrophy in the ocean[J]. *Nature*, 2001, 411(6839): 786-789.
- [14] Man D, Wang W W, Sabehi G, *et al.* Diversification and spectral tuning in marine proteorhodopsins[J]. *EMBO J*, 2003, 22(8): 1725-1731.
- [15] Pinhassi J, DeLong E F, Bějá O, *et al.* Marine bacterial and archaeal ion-pumping rhodopsins: genetic diversity, physiology, and ecology[J]. *Microbiology & Molecular Biology Reviews*, 2016, 80(4): 929-954.
- [16] Hunt K A, Flynn J M, Naranjo B, *et al.* Substrate-level phosphorylation is the primary source of energy conservation during anaerobic respiration of *Shewanella oneidensis* strain MR-1[J]. *Journal of Bacteriology*, 2010, 192(13): 3345-3351.
- [17] Gómez-Consarnau L, Akram N, Lindell K, *et al.* Proteorhodopsin phototrophy promotes survival of marine bacteria during starvation[J]. *PLoS Biology*, 2010, 8(4): e1000358.
- [18] Feng S, Powell S M, Wilson R, *et al.* Light-stimulated growth of proteorhodopsin-bearing sea-ice psychrophile *Psychroflexus torquis* is salinity dependent[J]. *ISME J*, 2013, 7(11): 2206-2213.
- [19] Olson D K, Yoshizawa S, Boeuf D, *et al.* Proteorhodopsin variability and distribution in the North Pacific Subtropical Gyre[J]. *ISME J*, 2018, 12(4): 1047-1060.
- [20] Balashov S P, Imasheva E S, Boichenko V A, *et al.* Xanthorhodopsin: a proton pump with a light-harvesting carotenoid antenna[J]. *Science*, 2005, 309(5743): 2061-2064.
- [21] Misra R, Eliash T, Sudo Y, *et al.* Retinal-salinixanthin interactions in a thermophilic rhodopsin[J]. *Journal of Physical Chemistry B*, 2019, 123(1): 10-20.
- [22] Anashkin V A, Bertsova Y V, Mamedov A M, *et al.* Engineering a carotenoid-binding site in *Dokdonia* sp. PRO95 Na⁺-translocating rhodopsin by a single amino acid substitution[J]. *Photosynthesis Research*, 2018, 136(2): 161-169.
- [23] Vollmers J, Voget S, Dietrich S, *et al.* Poles apart: Arctic and Antarctic *Octadecabacter* strains share high

- genome plasticity and a new type of xanthorhodopsin[J]. *PLoS One*, 2013, 8(5): e63422.
- [24] Strauss J, Deng L J, Gao S Q, *et al.* Plastid-localized xanthorhodopsin increases diatom biomass and ecosystem productivity in iron-limited surface oceans[J]. *Nat Microbiol*, 2023, 8(11): 2050-2066.
- [25] Inoue K, Ono H, Abe-Yoshizumi R, *et al.* A light-driven sodium ion pump in marine bacteria[J]. *Nature Communications*, 2013, 4: 1678.
- [26] da Silva G F Z, Goblirsch B R, Tsai A L, *et al.* Cation-specific conformations in a dual-function ion-pumping microbial rhodopsin[J]. *Biochemistry*, 2015, 54(25): 3950-3959.
- [27] Kato H E, Inoue K, Abe-Yoshizumi R, *et al.* Structural basis for Na⁺ transport mechanism by a light-driven Na⁺ pump[J]. *Nature*, 2015, 521: 48-53.
- [28] Gushchin I, Shevchenko V, Polovinkin V, *et al.* Crystal structure of a light-driven sodium pump[J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2015, 22: 390-395.
- [29] Bertsova Y V, Arutyunyan A M, Bogachev A V. Na⁺-translocating rhodopsin from *Dokdonia* sp. PRO95 does not contain carotenoid antenna[J]. *Biochemistry*, 2016, 81(4): 414-419.
- [30] Tarlachkov S V, Shevchuk T V, Montero-Calasanz M D C, *et al.* Diversity of rhodopsins in cultivated bacteria of the family Geodermatophilaceae associated with non-aquatic environments[J]. *Bioinformatics*, 2020, 36(6): 1668-1672.
- [31] Kwon Y M, Kim S Y, Jung K H, *et al.* Diversity and functional analysis of light-driven pumping rhodopsins in marine Flavobacteria[J]. *Microbiologyopen*, 2016, 5(2): 212-223.
- [32] Yoshizawa S, Kumagai Y, Kim H, *et al.* Functional characterization of flavobacteria rhodopsins reveals a unique class of light-driven chloride pump in bacteria[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, 111(18): 6732-6737.
- [33] Matsuno-Yagi A, Mukohata Y. Two possible roles of bacteriorhodopsin; a comparative study of strains of *Halobacterium halobium* differing in pigmentation[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1977, 78(1): 237-243.
- [34] Mukohata Y, Kaji Y. Light-induced membrane-potential increase, ATP synthesis, and proton uptake in *Halobacterium halobium*, R1mR catalyzed by halorhodopsin: effects of N, N'-dicyclohexylcarbodiimide, triphenyltin chloride, and 3, 5-di-tert-butyl-4-hydroxybenzylidenemalonitrile (SF6847) [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1981, 206(1): 72-76.
- [35] Schobert B, Lanyi J K. Halorhodopsin is a light-driven chloride pump[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1982, 257(17): 10306-10313.
- [36] Hasemi T, Kikukawa T, Kamo N, *et al.* Characterization of a cyanobacterial chloride-pumping rhodopsin and its conversion into a proton pump[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2016, 291(1): 355-362.
- [37] Nakajima Y, Tsukamoto T, Kumagai Y, *et al.* Presence of a haloarchaeal halorhodopsin-like Cl⁻ pump in marine bacteria[J]. *Microbes and Environments*, 2018, 33(1): 89-97.
- [38] Inoue K, Ito S, Kato Y, *et al.* A natural light-driven inward proton pump[J]. *Nature Communications*, 2016, 7: 13415.
- [39] Kwon Y M, Kim S J. Complete genomes of the marine flavobacterium *Nonlabens* strains YIK11 and MIC269 [J]. *Mar Genomics*, 2018, 37: 46-49.
- [40] Inoue K, Koua F H M, Kato Y, *et al.* Spectroscopic study of a light-driven chloride ion pump from marine bacteria[J]. *Journal of Physical Chemistry B*, 2014, 118(38): 11190-11199.
- [41] Spudich E N, Spudich J L. Control of transmembrane ion fluxes to select halorhodopsin-deficient and other energy-transduction mutants of *Halobacterium halobium* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1982, 79(14): 4308-4312.
- [42] Bogomolni R A, Spudich J L. Identification of a third rhodopsin-like pigment in phototactic *Halobacterium halobium* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1982, 79(20): 6250-6254.
- [43] Tomioka H, Takahashi T, Kamo N, *et al.* Flash spectrophotometric identification of a fourth rhodopsin-like pigment in *Halobacterium halobium* [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1986, 139(2): 389-395.
- [44] Spudich E N, Sundberg S A, Manor D, *et al.* Properties of a second sensory receptor protein in *Halobacterium halobium* phototaxis[J]. *Proteins*, 1986, 1(3): 239-246.
- [45] Sudo Y, Spudich J L. Three strategically placed hydrogen-bonding residues convert a proton pump into a sensory receptor[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(44): 16129-16134.
- [46] Jung K H, Trivedi V D, Spudich J L. Demonstration of a sensory rhodopsin in eubacteria[J]. *Mol Microbiol*, 2003, 47(6): 1513-1522.
- [47] Irieda H, Morita T, Maki K, *et al.* Photo-induced regu-

- lation of the chromatic adaptive gene expression by *Anabaena* sensory rhodopsin[J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(39): 32485-32493.
- [48] Kawanabe A, Furutani Y, Jung K H, *et al.* Engineering an inward proton transport from a bacterial sensor rhodopsin[J]. *J Am Chem Soc*, 2009, 131(45): 16439-16444.
- [49] Ugalde J A, Podell S, Narasingarao P, *et al.* Xenorhodopsins, an enigmatic new class of microbial rhodopsins horizontally transferred between Archaea and bacteria [J]. *Biol Direct*, 2011, 6: 52.
- [50] Tang K, Lin D, Liu K S, *et al.* Draft genome sequence of *Parvularcula oceani* JLT2013(T), a rhodopsin-containing bacterium isolated from deep-sea water of the Southeastern Pacific[J]. *Mar Genomics*, 2015, 24: 211-213.
- [51] Vavourakis C D, Ghai R, Rodriguez-Valera F, *et al.* Metagenomic insights into the uncultured diversity and physiology of microbes in four hypersaline soda lake brines[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 211.
- [52] Inoue K, Tsunoda S P, Singh M, *et al.* Schizorhodopsins: a family of rhodopsins from Asgard Archaea that function as light-driven inward H⁺ pumps[J]. *Science Advances*, 2020, 6(15): eaaz2441.
- [53] Foster K W, Saranak J, Patel N, *et al.* A rhodopsin is the functional photoreceptor for phototaxis in the unicellular eukaryote *Chlamydomonas*[J]. *Nature*, 1984, 311(5988): 756-759.
- [54] Nagel G, Ollig D, Fuhrmann M, *et al.* Channelrhodopsin-1: A light-gated proton channel in green algae[J]. *Science*, 2002, 296(5577): 2395-2398.
- [55] Nagel G, Szellas T, Huhn W, *et al.* Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel[J]. *The National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 100(24): 13940-13945.
- [56] Govorunova E G, Sineshchekov O A, Li H, *et al.* Microbial rhodopsins: diversity, mechanisms, and optogenetic applications[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2017, 86: 845-872.
- [57] Rozenberg A, Oppermann J, Wietek J, *et al.* Lateral gene transfer of anion-conducting channelrhodopsins between green algae and giant viruses[J]. *Current Biology*, 2020, 30(24): 4910-4920.
- [58] Schneider F, Grimm C, Hegemann P. Biophysics of channelrhodopsin[J]. *Annual Review of Biophysics*, 2015, 44: 167-186.
- [59] Oppermann J, Fischer P, Silapetere A, *et al.* MerMAIDs: a family of metagenomically discovered marine anion-conducting and intensely desensitizing channelrhodopsins[J]. *Nature Communications*, 2019, 10(1): 3315.
- [60] Govorunova E G, Sineshchekov O A, Li H, *et al.* RubyACRs, nonalgal anion channelrhodopsins with highly red-shifted absorption[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2020, 117(37): 22833-22840.
- [61] Mukherjee S, Hegemann P, Broser M. Enzymerhodopsins: novel photoregulated catalysts for optogenetics[J]. *Curr Opin Struct Biol*, 2019, 57: 118-126.
- [62] Kateriya S, Nagel G, Bamberg E, *et al.* "Vision" in single-celled algae[J]. *News Physiol Sci*, 2004, 19: 133-137.
- [63] Tian Y H, Gao S Q, von der Heyde E L, *et al.* Two-component cyclase opsins of green algae are ATP-dependent and light-inhibited guanylyl cyclases [J]. *BMC Biol*, 2018, 16(1): 144.
- [64] Luck M, Mathes T, Bruun S, *et al.* A photochromic histidine kinase rhodopsin (HKR1) that is bimodally switched by ultraviolet and blue light[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2012, 287(47): 40083-40090.
- [65] Kianianmomeni A, Hallmann A. Transcriptional analysis of *Volvox* photoreceptors suggests the existence of different cell-type specific light-signaling pathways[J]. *Current Genetics*, 2015, 61(1): 3-18.
- [66] Pfeuty B, Thommen Q, Corellou F, *et al.* Circadian clocks in changing weather and seasons: lessons from the picoalga *Ostreococcus tauri*[J]. *Bioessays*, 2012, 34(9): 781-790.
- [67] Avelar G M, Schumacher R I, Zaini P A, *et al.* A rhodopsin-guanylyl cyclase gene fusion functions in visual perception in a fungus[J]. *Current Biology*, 2014, 24(11): 1234-1240.
- [68] Gao S Q, Nagpal J, Schneider M W, *et al.* Optogenetic manipulation of cGMP in cells and animals by the tightly light-regulated guanylyl-cyclase opsin CycloP [J]. *Nature Communications*, 2015, 6: 8046.
- [69] Broser M, Spreen A, Konold P E, *et al.* NeoR, a near-infrared absorbing rhodopsin[J]. *Nature Communications*, 2020, 11(1): 5682.
- [70] Yoshida K, Tsunoda S P, Brown L S, *et al.* A unique choanoflagellate enzyme rhodopsin exhibits light-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase activity[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2017, 292(18): 7531-7541.
- [71] Pushkarev A, Inoue K, Larom S, *et al.* A distinct abundant group of microbial rhodopsins discovered using functional metagenomics[J]. *Nature*, 2018, 558(7711):

- 595-599.
- [72] Tanaka T, Singh M, Shihoya W, *et al.* Structural basis for unique color tuning mechanism in heliorhodopsin [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 533(3): 262-267.
- [73] Singh M, Inoue K, Pushkarev A, *et al.* Mutation study of heliorhodopsin 48C12[J]. *Biochemistry*, 2018, 57(33): 5041-5049.
- [74] Tahara S, Singh M, Kuramochi H, *et al.* Ultrafast dynamics of heliorhodopsins[J]. *Journal of Physical Chemistry B*, 2019, 123(11): 2507-2512.
- [75] Chazan A, Rozenberg A, Mannen K, *et al.* Diverse heliorhodopsins detected via functional metagenomics in freshwater Actinobacteria, Chloroflexi and Archaea[J]. *Environ Microbiol*, 2022, 24(1): 110-121.
- [76] Cho S G, Kim J H, Lee J E, *et al.* Heliorhodopsin-mediated light-modulation of ABC transporter[J]. *Nat Commun*, 2024, 15(1): 4306.
- [77] Flores-Urbe J, Hevroni G, Ghai R, *et al.* Heliorhodopsins are absent in diderm (Gram-negative) bacteria: some thoughts and possible implications for activity[J]. *Environ Microbiol Rep*, 2019, 11(3): 419-424.
- [78] Boyden E S, Zhang F, Bamberg E, *et al.* Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity[J]. *Nat Neurosci*, 2005, 8(9): 1263-1268.
- [79] Klapoetke N C, Murata Y, Kim S S, *et al.* Independent optical excitation of distinct neural populations[J]. *Nat Methods*, 2014, 11(3): 338-346.
- [80] Zhang F, Wang L P, Brauner M, *et al.* Multimodal fast optical interrogation of neural circuitry[J]. *Nature*, 2007, 446(7136): 633-639.
- [81] Gradinaru V, Zhang F, Ramakrishnan C, *et al.* Molecular and cellular approaches for diversifying and extending optogenetics[J]. *Cell*, 2010, 141(1): 154-165.
- [82] Govorunova E G, Sineshchekov O A, Janz R, *et al.* NEUROSCIENCE. Natural light-gated anion channels: a family of microbial rhodopsins for advanced optogenetics[J]. *Science*, 2015, 349(6248): 647-650.
- [83] Kralj J M, Douglass A D, Hochbaum D R, *et al.* Optical recording of action potentials in mammalian neurons using a microbial rhodopsin[J]. *Nat Methods*, 2011, 9(1): 90-95.
- [84] Piatkevich K D, Jung E E, Straub C, *et al.* A robotic multidimensional directed evolution approach applied to fluorescent voltage reporters[J]. *Nat Chem Biol*, 2018, 14(4): 352-360.
- [85] Pushkarev A, Béjà O. Functional metagenomic screen reveals new and diverse microbial rhodopsins[J]. *ISME Journal*, 2016, 10(9): 2331-2335.
- [86] Atamna-Ismaeel N, Finkel O M, Glaser F, *et al.* Microbial rhodopsins on leaf surfaces of terrestrial plants [J]. *Environmental Microbiology*, 2012, 14(1): 140-146.
- [87] Guerrero L D, Vikram S, Makhalyane T P, *et al.* Evidence of microbial rhodopsins in Antarctic Dry Valley edaphic systems[J]. *Environmental Microbiology*, 2017, 19(9): 3755-3767.
- [88] Yue L, Weiland J D, Roska B, *et al.* Retinal stimulation strategies to restore vision: Fundamentals and systems[J]. *Prog Retin Eye Res*, 2016, 53: 21-47.
- [89] Tashiro R, Sushmita K, Hososhima S, *et al.* Specific residues in the cytoplasmic domain modulate photocurrent kinetics of channelrhodopsin from *Klebsormidium nitens*[J]. *Commun Biol*, 2021, 4(1): 235.
- [90] Kianianmomeni A, Stehfest K, Nematollahi G, *et al.* Channelrhodopsins of *Volvox carteri* are photochromic proteins that are specifically expressed in somatic cells under control of light, temperature, and the sex inducer [J]. *Plant Physiology*, 2009, 151(1): 347-366.
- [91] Govorunova E G, Sineshchekov O A, Li H, *et al.* Characterization of a highly efficient blue-shifted channelrhodopsin from the marine alga *Platymonas subcordiformis*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2013, 288(41): 29911-29922.
- [92] Lin J Y. A user's guide to channelrhodopsin variants: features, limitations and future developments[J]. *Experimental Physiology*, 2011, 96(1): 19-25.

□

(编辑: 杨晓翠 肖展春)