

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 24 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2012～2014

課題番号：24681003

研究課題名(和文)プロテオロドプシンを通して海洋生態系に流れ込む太陽光エネルギーの定量化

研究課題名(英文)Quantitative analysis of the proteorhodopsin-mediated sunlight energy that flows through marine ecosystem

研究代表者

吉澤 晋(Yoshizawa, Susumu)

東京大学・大気海洋研究所・講師

研究者番号：00553108

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、PRが受け取る太陽光エネルギーの定量化を目指した。計画当初は、海洋細菌の持つロドプシンはPR(光駆動型H⁺輸送ロドプシン)しか見つかっておらず、PRの光エネルギー利用効率の測定のみを行う予定であった。しながら、PR遺伝子を持つ海洋細菌株のゲノムを調べた結果、新しく光駆動型Na⁺輸送ロドプシン、比較駆動型Cl⁻輸送ロドプシンが存在することが明らかになり、ロドプシンによる光エネルギー利用がこれまで考えられていた以上に多様であることが示された。今後は各ロドプシンの光エネルギー利用効率も解析し、海洋細菌の持つロドプシンが受け取る太陽光エネルギーの定量化を目指す。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to evaluate the proteorhodopsin-mediated sunlight energy flow. In the beginning of the study, proteorhodopsin (PR) was the only type 1 rhodopsin found in marine bacteria. Therefore, the first research plan was designed only for the proteorhodopsin-mediated phototrophy. However, novel type 1 rhodopsins, such as sodium ion pumping rhodopsin (NaR) and chloride ion pumping rhodopsin (ClR), were discovered in marine flavobacteria by the genomic analysis and reported by our group during the research period. This result shows the ways of rhodopsin-mediated light utilization are more diverse than previously thought. In the future, investigating the light use efficiency of each rhodopsin is needed for the evaluation of the rhodopsin-mediated sunlight energy flow.

研究分野：環境動態解析

キーワード：ロドプシン プロテオロドプシン 物質循環 海洋細菌 微生物海洋学 光エネルギー

1. 研究開始当初の背景

海洋表層の光エネルギーの利用は従来 Cyanobacteria に代表される酸素発生型の光合成生物に限定されて考えられてきた。しかしながら、この常識は 2000 年以後の相次ぐ発見により大きく揺らぎつつある。2000 年に海水をターゲットとしたメタゲノム解析から、ロドプシンが海洋細菌の間に広く分布することが明らかになり (Beja et al., 2000) プロテオロドプシン (以下、PR) と命名された。PR はオプシントタンパクに発光団のレチナルが結合した光受容タンパクで、光を受容すると細胞内からプロトンを排出して膜電位を形成し、そのエネルギーで ATP 合成をする。言わば、“光駆動型プロトンポンプ”である。

その後、海洋環境中で PR 遺伝子が続々と見つかり、海洋細菌の数 % (多い海域で約 80%) がこの遺伝子を保持すると現在では見積もられており、PR を通して海洋生態系に流れ込む太陽光エネルギー量の推定は地球規模エネルギー循環の理解に必要不可欠であると考えられている (Fuhrman et al., 2008)。しかしながら、この値は現在のところ全く分かっていない。

その理由は大きく 2 つある。

1. PR 遺伝子を持つ細菌は“難培養性”であり、これまでに細菌分離株は 7 種、10 株しかなく、培養株を用いた厳密な生理生態学的な解析を行った研究例が乏しい事。
2. プロトンポンプ活性の定量的な解析に世界中の誰も成功していない事。

この様な背景をふまえ、培養法の改善と、ポンプ活性の定量化実験系の開発を行った。培養法を検討した結果、様々な海域から合計 74 株の PR 保持細菌の分離に成功した。この保有数は世界一である。また、野生株のプロトンポンプ活性を測定かつ定量化できる実験系を名古屋工業大学と共同で構築し、野生株から直接ポンプ活性を測定することに世界で初めて成功した。また、これまでに 1 株ではあるが、ポンプ活性を定量化することに成功している。世界一の PR 保持菌株のストックと、新規に構築した実験系を統合的に駆使することで、世界に先駆けて“PR を通して海洋生態系へ流れ込む太陽エネルギー量”を推定することが可能となった。

2. 研究の目的

本研究では、応募者が所有する PR 保持分離株を用いた PR の機能・制御機構・ゲノム解析を軸に、フィールド研究を組み合わせ、PR を通して海洋生態系に流れ込む太陽光エネルギー量を明らかにし、従来のクロロフィル型の光合成プロセスのみを考慮して作り上げられてきた海洋生態系におけるエネルギー循環のパラダイムシフトを目指す。

3. 研究の方法

- PR のプロトンポンプ活性の定量化

これまでの研究で分離培養に成功した PR 保持細菌および開発した測定系を用いて、様々な培養条件下 (貧栄養-富栄養条件、明-暗条件、低-高温条件、低-高 pH 条件) でのポンプ活性の定量化を行った。

- PR 保持細菌の発現解析およびゲノム解析

様々な培養条件で培養した分離株 (20 株を予定) を用いて、PR の mRNA を定量 PCR で検出し、PR 発現条件の解析を行った。ポンプ活性の測定から、貧栄養培地でのみ PR を発現するグループが見つかり、mRNA を解析する事により詳細な発現条件を明らかにすることができた。貧栄養培地の組成は、Gomez-Consarnau et al. (2007) に従った。また、PR 保持分離株 10 株のゲノム解析を実施した。

- 新規ロドプシンの機能解析

ゲノム解析から得たゲノム情報およびデータベース上に登録されているゲノム情報を用いて、新規ロドプシンの探索を実施した。機能未知ロドプシンは異種発現系を用いて機能解析を行った。

- 海洋中の PR タンパク質の定量化

海水中における PR タンパク質量の定量化の予備実験を実施した。具体的には、複数の PR 保持細菌分離株を培養後、フィルター濾過、それらのサンプルを用いて、PR タンパク質の検出に最適な条件の検討を行った。

4. 研究成果

様々な培養条件・測定条件下で PR のプロトンポンプ活性の定量化を行った結果、PR のプロトン排出速度は温度 (10-37 °C) や pH (pH5-9) の影響を顕著に受けないことがわかった。これまで精製したロドプシントタンパク質を用いた物理化学的な測定からは、pH 変化がプロトン排出に大きな影響を与えると予想されていた。しかしながら、今回の測定系では pH の影響を観察することができなかった。生息環境の pH 変化は細胞生理に大きな影響を与えると予想されることから、今後網羅的 mRNA 等の詳細な解析を実施し、pH 変化が遺伝子発現に与える影響も調べる予定である。また、本結果から極域に生息する PR 保持細菌も低温環境下でプロトン排出することが示された。また PR 遺伝子の mRNA の検出から、培地の栄養条件に関わらず光が PR 遺伝子発現を促進することが分かった。

ゲノム解析から得たゲノム情報およびデータベース上に登録されているゲノム情報を精査した結果、機能未知ロドプシンを 2 つ見つけることに成功した。海洋性フラボバクテリア *Krokinobacter eikastus* から光で Na⁺ を輸送するロドプシン (NaR と命名) 海洋性フラボバクテリア *Nonlabens marinus* から光で Cl⁻ を輸送するロドプシン (ClR と命名) を発見し、報告した。これらの新規ロドプシンは遺伝子発現条件や細胞内生理に与える影響等の基礎的な事柄もほとんど分かっている。

ない、今後これらの事柄を解明することで海洋細菌の光エネルギー利用に関する理解が深まると考えられる。

ロドプシタンパク質はクロロフィル色素と異なり、蛍光能を持たない。そのため、海水中に存在するロドプシタンパク質の定量が困難である。本研究では、大量の海水を濾過したフィルターから分光学的な手法を用いることでロドプシタンパク質の定量化を目指している。計画当初は、PR タンパク質の定量化のみを想定していたが、これまでの研究から新たなロドプシンが見つかったため、ゲノムデータが存在し、各ロドプシン遺伝子を持つ培養株を用いて細胞内ロドプシタンパク質の定量化手法の最適化を行った。今後、外洋海水濾過フィルターを用いて各ロドプシタンパク質の定量化を実施する予定である。

本研究で、海洋細菌が持つロドプシンはH⁺輸送型のPRの他にも、光エネルギーでNa⁺を輸送するNaRや、Cl⁻を輸送するClRが存在することが分かった。海洋中に最も豊富に存在するこれらのイオンを輸送するロドプシンが見つかったことで、研究当初に想定していた以上に海洋細菌による光エネルギー利用機構が多様であることが示された。また、ロドプシタンパク質が太陽光から受け取るエネルギー量の算出に必要な、in vivo 活性測定のための基盤を構築することができた。今後は、新規に見つかったロドプシンの光エネルギー利用効率や外洋海水中における存在量を正確に測定することで、太陽光からロドプシンが受け取るエネルギー量の正確な見積もりが期待できる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計7件)

Hyunsang Lee, Susumu Yoshizawa, Kazuhiro Kogure, Hyun Soo Kim and Jaewoo Yoon (2014) *Pelagitalea pacifica* gen. nov., sp. nov., a New Marine Bacterium Isolated from Seawater. *Current Microbiology* 1-6.

DOI:10.1007/s00284-014-0750-1

Yohei Kumagai, Susumu Yoshizawa, Kenshiro Oshima, Masahira Hattori, Wataru Iwasaki, and Kazuhiro Kogure (2014) Complete Genome Sequence of *Winogradskyella* sp. PG-2, a Proteorhodopsin-Containing Marine Flavobacterium. *Genome announcements* 2(3):e00490-14.

DOI:10.1128/genomeA.00490-1

Susumu Yoshizawa, Yohei Kumagai, Hana Kim, Yoshitoshi Ogura, Tetsuya Hayashi, Wataru Iwasaki, Edward F. DeLong and Kazuhiro Kogure (2014)

Functional characterization of flavobacteria rhodopsins reveals a unique class of light-driven chloride pump in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111,(18), 6732-6737.

DOI:10.1073/pnas.1403051111

Keiichi Inoue, Hikaru Ono, Rei Abe-Yoshizumi, Susumu Yoshizawa, Hiroyasu Ito, Kazuhiro Kogure and Hideki Kandori (2013) A light-driven sodium pump in marine bacteria. *Nature Communications* 4, Article number: 1678.

DOI: 10.1038/ncomms2689

Sanghwa Park, Jaeho Song, Susumu Yoshizawa, Ayoung Choi, Jang-Cheon Cho and Kazuhiro Kogure (2013) *Rubrivirga marina*, gen. nov., sp. nov., a member of the family Rhodothermaceae isolated from the deep sea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 63, 2229-2233.

DOI: 10.1099/ijs.0.046318-0

Sanghwa Park, Susumu Yoshizawa, Yuki Muramatsu, Yasuyoshi Nakagawa, Akira Yokota and Kazuhiro Kogure (2013) *Aureicoccus marinus* gen. nov., sp. nov., a member of the family Flavobacteriaceae, isolated from Pacific ocean. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 63, 1885-1890.

DOI: 10.1099/ijs.0.045104-0

Sanghwa Park, Susumu Yoshizawa, Chiura Hiroshi, Yuki Muramatsu, Yasuyoshi Nakagawa, Kazuhiro Kogure and Akira Yokota (2012) *Nonlabens marina* sp. nov., a novel marine bacterium isolated from Pacific Ocean. *Antonie Van Leeuwenhoek* 102, 669-676.

DOI: 10.1007/s10482-012-9765-4

[学会発表](計19件)

Susumu Yoshizawa, Yohei Kumagai, Hana Kim, Yoshitoshi Ogura, Tetsuya Hayashi, Wataru Iwasaki, Edward F. DeLong and Kazuhiro Kogure. Functional diversification in bacterial rhodopsins: a new class of light-driven Cl⁻ pumps in marine flavobacteria. *International Symposium on Genome Science 2015 "Expanding Frontiers of Genome Science II"*. Tokyo, Japan. Jan. 20-21,

2015.

吉澤晋. ゲノム解析が切り開く微生物の新しい光エネルギー機構. 「次世代ゲノム科学の最前線」, 文部科学省科学研究費新学術領域研究「ゲノム支援」公開シンポジウム. 東京国際フォーラム. 東京. Dec. 12, 2014.

Susumu Yoshizawa, Yohei Kumagai, Hana Kim, Yoshitoshi Ogura, Tetsuya Hayashi, Wataru Iwasaki, Edward F. DeLong, and Kazuhiro Kogure. Light-driven transmembrane H⁺, Na⁺ and Cl⁻ pumping is mediated by three different rhodopsins in a marine flavobacterium. 環境微生物系学会合同大会 2014. 浜松アクトシティコンgresセンター. 浜松. Oct. 24, 2014.

熊谷洋平, 吉澤晋, 福永津嵩, 渡辺麻衣, 池内昌彦, 小椋義俊, 林哲也, 木暮一啓, 岩崎渉. 大規模比較ゲノム解析が明らかにする、プロテオロドプシンを持つ海洋細菌のゲノム進化. 環境微生物系学会合同大会 2014. 浜松アクトシティコンgresセンター. 浜松. Oct. 24, 2014.

熊谷洋平, 吉澤晋, 木暮一啓, 岩崎渉. 比較ゲノム解析によるプロテオロドプシン及びレチナル合成系の進化史の解明. NGS 現場の会第三回研究会, 神戸国際会議場. 神戸. Sep. 4-5, 2014.

Yohei Kumagai, Susumu Yoshizawa, Tsukasa Fukunaga, Yoshitoshi Ogura, Tetsuya Hayashi, Edward F. DeLong, Kazuhiro Kogure, Wataru Iwasaki. Gains and losses of proteorhodopsin genes affect genomic evolution. 15th International Society for Microbial Ecology. Seoul, Korea. Aug. 25, 2014.

Susumu Yoshizawa, Yohei Kumagai, Hana Kim, Yoshitoshi Ogura, Tetsuya Hayashi, Wataru Iwasaki, Edward F. DeLong and Kazuhiro Kogure. Functional diversification in bacterial rhodopsins: a new class of light-driven Cl⁻ pumps in marine flavobacteria. 15th International Society for Microbial Ecology. Seoul, Korea. Aug. 28, 2014.

Susumu Yoshizawa, Kazuhiro Kogure and Edward F. DeLong. A light-induced sodium ion pumping rhodopsin in marine flavobacteria. 114th ASM (American society for microbiology) general meeting, Boston, Massachusetts, USA. May 17-20, 2014.

熊谷洋平, 吉澤晋, 木暮一啓, 岩崎渉. 大規模比較ゲノム解析が明らかにするプロテオロドプシンを持つ海洋細菌のゲノム進化, 第 8 回日本ゲノム微生物学会年会, 東京農業大学世田谷キャン

パス, 東京. Mar. 7, 2014.

Michael Valliere, Hana Kim, Susumu Yoshizawa and Edward F. DeLong. Changes in the growth physiology of different proteorhodopsin-containing marine flavobacteria at low and high nutrient concentrations. ASLO (Association for the Sciences of Limnology and Oceanography) Aquatic Science Meeting, Honolulu, Hawaii, USA. Feb. 23-28, 2014.

Susumu Yoshizawa, Kazuhiro Kogure and Edward F. DeLong. Light-driven sodium pumps in marine bacteria: a new type of microbial rhodopsin. ASLO (Association for the Sciences of Limnology and Oceanography) Aquatic Science Meeting, Honolulu, Hawaii, USA. Feb. 23-28, 2014.

熊谷洋平, 吉澤晋, 木暮一啓, 岩崎渉. 大規模比較ゲノム解析が明らかにするプロテオロドプシンを持つ海洋細菌のゲノム進化, 生命情報科学若手の会第 5 回研究会, 東京大学検見川セミナーハウス, 千葉. Feb. 17, 2014.

中島悠・吉澤晋・木暮一啓. *Vibrio* 属細菌におけるプロテオロドプシンの発現条件および生理的役割の解明. 第 29 回日本微生物生態学会, 鹿児島大学郡元キャンパス, 鹿児島. Nov. 23-35, 2013.

Susumu Yoshizawa, Kazuhiro Kogure. Light-driven sodium pump, a new type of rhodopsin. 5th Taiwan-Korea-Japan International Symposium on Microbial Ecology, Jhongli, Taiwan. Oct. 31, 2013.

Yu Nakajima, Susumu Yoshizawa, Kazuhiro Kogure. Quantification of the proton pump activity of proteorhodopsin in *Vibrio campbellii*. 13th Aquatic Microbial Ecology (SAME13), Stresa, Italy. Sep. 8-13, 2013.

吉澤晋. 海洋細菌の持つロドプシン - 新しい光エネルギー利用機構 -, 第 1 回日本細胞共生学会若手の会, 下田臨海実験センター, 静岡. Nov. 7, 2012.

吉澤晋. 分子生物学的アプローチに基づく微生物生態学に必要なとされる分類学的知見とは?, 第 32 回日本微生物系統分類研究会年次大会, 産業技術総合研究所, つくば. Nov. 16, 2012.

吉澤晋. クロロフィルとロドプシン光をめぐる奇妙な関係, 第 7 回日本光合成学会若手の会, 中房温泉, 長野. Oct. 14, 2012

吉澤晋. 培養法で切り拓くロドプシンの新生物機能, 第 28 回日本微生物生態学会, 豊橋技術科学大学, 愛知. Sep. 20, 2012.

Susumu Yoshizawa, Akira Kawanabe,
Hiroyasu Ito, Hideki Kandori and
Kazuhiro Kogure. Impact of
Proteorhodopsin-mediated
phototrophy in marine environment.
15th International Conference on
Retinal Proteins, Ascona, Switzerland.
Oct.1, 2012.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

プレスリリース：海洋細菌で見つけた
新しい光エネルギー利用機構 - 塩化物
イオンを輸送するポンプの発見 -
(<http://www.aori.u-tokyo.ac.jp/research/news/2014/20140408.html>)

プレスリリース：36年ぶりの新発見！
光でナトリウムイオンを輸送するポン
プ型タンパク質！！
(<http://www.nitech.ac.jp/news/news/2013/1942.html>)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉澤 晋 (YOSHIZAWA, Susumu)

東京大学・大気海洋研究所・講師

研究者番号： 00553108