

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 9 月 25 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21380123

研究課題名（和文） プロテオロドプシンをもつ海洋発光細菌の光生態学的研究

研究課題名（英文） Ecological study on marine luminous bacteria possessing proteorhodopsin

研究代表者 木暮一啓 (KAZUHIRO KOGURE)

東京大学・大気海洋研究所・教授

研究者番号：10161895

研究成果の概要（和文）：

プロテオロドプシンは光エネルギーを使ってプロトン排出を行い、ATP合成を可能にする膜タンパクの一つで、2000年に初めて見いだされた。遺伝子レベルの解析によって海洋表層中の細菌群集の半分程度に存在すると推定されている。しかし分離株が世界にも10株程度しかなく、生理的な機能、とりわけプロトンポンプ機能の直接的な確認、および環境要因がそれを与える影響などについては未知のままだった。研究代表者らは、海洋から60株を超えるプロテオロドプシン保持株を分離し、世界最大のコレクションを作るとともに、それらを用いてプロトン排出機能を直接測定することに世界で初めて成功した。さらに、いくつかの仮定を置くことによって、プロテオロドプシン保持株による海洋でのエネルギー吸収量は、光合成によるエネルギー吸収量の須君白とも2-3割に相当することを明らかにした。これにより、プロテオロドプシンの地球表層域におけるエネルギーフローについての貢献は無視できないほど大きいことを示すと同時に、それによって得られたエネルギーの地球表層域におけるフロー、起源、遺伝子の分布と伝搬、立体構造、光合成との光競合等、様々な関連研究に対してその意義を明確にし、今後の研究を刺激しつつある。

研究成果の概要（英文）：

Proteorhodopsin (PR) is a membrane protein that absorbs light energy and functions as proton pump. The proton gradient thus established enables the cells to synthesize ATP, thus serves as efficient energy synthesis component. This was first reported in 2000. Since then there have been estimated that nearly half of prokaryotes present in the upper water column in the ocean may possess PR. However, so far only about 10 isolates had been reported to possess PR, that makes any further physiological investigations difficult. Our group succeeded to isolate more than 60 strains and directly measure the activity of proton pump under light. In addition, with further assumptions we succeeded to estimate the contribution of PR to light energy absorption to the ocean for the first time. The research on PR is now expanding after our investigation using isolates.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 21 年度	7,400,000	2,220,000	9,620,000
平成 22 年度	3,200,000	960,000	4,160,000
平成 23 年度	3,100,000	930,000	4,030,000
総計	13,700,000	4,110,000	17,810,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：水産学一般

キーワード：プロテオロドプシン、海洋細菌、光エネルギー、

1. 研究開始当初の背景

プロテオロドプシン（以下 PR）は 2000 年に海水をターゲットとしたメタゲノム解析から発見された光受容タンパク質で、その機能は光駆動型プロトンポンプであると推定されていた。その後の分子生物学的手法を用いた研究から、外洋表層域の細菌の少なくとも数十%、おそらく半分程度が PR を持つことが明らかとなった。しかし、実際に PR を持つ分離株は 10 株ほどしか得られておらず、その生理的特性は不明であった。さらに、PR の機能は遺伝子を大腸菌に組み込んで発現させて確認したもので、もとの細胞で果たしてその通りに機能しているのか、どのような生理状態あるいは環境要因がプロトン排出に影響を与えているのか、プロトン排出能は実際にどの程度なのか、などの極めて基本的な疑問についてはまだ殆ど何もわかっていなかった。

2. 研究の目的

PR は実際にそれを持つ菌体の中で、プロトンポンプとして機能しているのだろうか、あるいは光センサーなどに利用されている可能性はないのだろうか。もしプロトンポンプとして機能していたとすると、その排出能はどの程度なのだろうか。またそれに影響を与える環境因子にはどのようなものがあるのだろうか。さらに、実際に海洋細菌のプロテオロドプシンがプロトンポンプとして機能しているならば、海洋生態系への影響はどの程度なのだろうか。

3. 研究の方法

これまで PR を持つと報告されてきた細菌株は必ずしも入手可能ではないし、増殖もよいわけではない。このため、まずはプロテオロドプシンを持つ細菌の分離を試みる。次いで、細胞自体を培養後、光チャンバーに入れ、光の存在下でプロトンが排出され、pH が下がることを確認する。さらに、これに与える影響、とりわけ温度の影響を見る。また、PR 遺伝子の詳細を明らかにし、その系統関係を調べる。さらに、光量、PR 保持菌数、ATP 合成効率などの仮定を置き、海洋における PR のエネルギー代謝に対する貢献を推定する。

4. 研究成果

以下の知見を明らかにした。

1. 66 株の PR 保持細菌の分離に成功した。

これにより、現在、世界で最も多くの PR 保持菌を得て、その解析を行っている。さらに 16S rDNA の解析によってそれらの株の系統関係を明らかにした。今回得た殆どの株は *Flavobacterium* に属す菌群であり、研究もその一群に注目して行った。

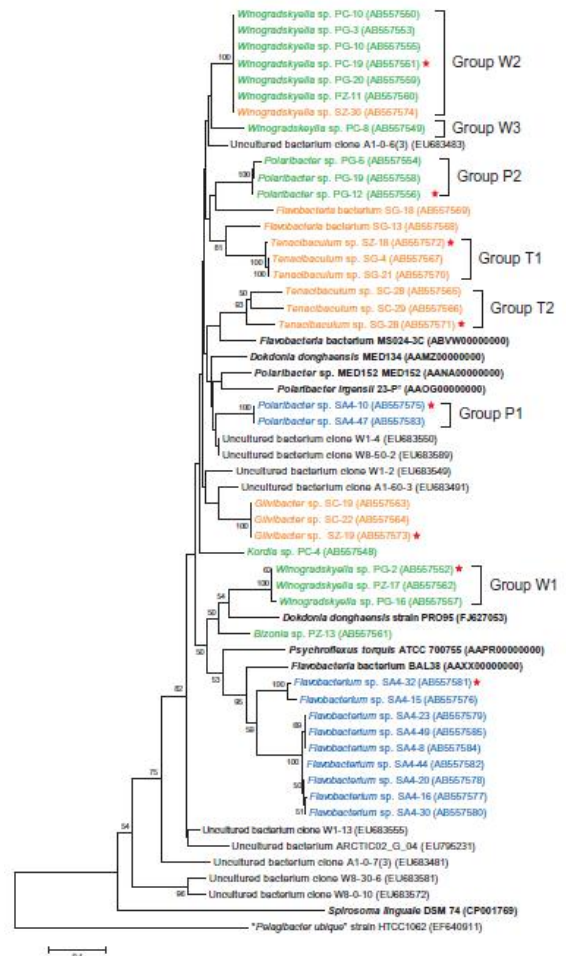


図 1. プロテオロドプシン保持株の PR 遺伝子系統解析結果

2. PR 遺伝子の系統解析を行い、それによって PR 遺伝子が *Flavobacterium* の中で遺伝子伝搬を行っている可能性を初めて明らかにした。

3. 実験的条件下で生細胞をチャンバーに入れ、光照射下でのプロトン排出を pH の変化によって確認した。また、CCCP の添加からこれが光を直接使うポンプであることを明らかにした。従来の検討は全て遺伝子を大腸菌

に組み込んで解析したもので、この結果は世界で初めて PR がプロトンポンプであることを実証したものである。

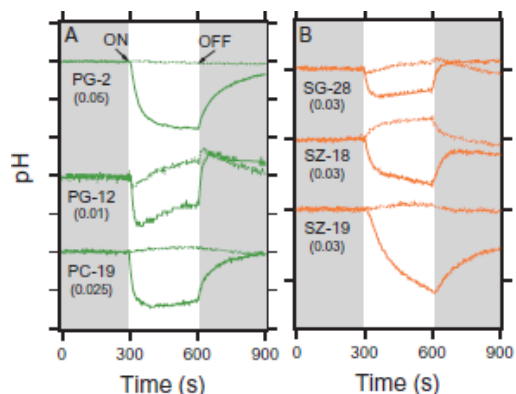


図2. 光チャンバーにおける照射下での pH 低下の確認。6 株のプロテオロドプシン保持株を用いた結果を示す。

4. 分離株の中で系統的に新規な株については分類的な作業を行い、種として報告したいずれも、当然ながら新種提案である。

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 11 件)

1. Yoshizawa Susumu, Minoru Wada, Akira Yokota, and Kazuhiro Kogure. 2010. *Vibrio sagamiensis* sp. nov., luminous marine bacteria isolated from sea water. The Journal of General and Applied Microbiology. 56(6): 499-507. (査読有)
2. Park, Sanghwa, Susumu Yoshizawa, Koji Hamasaki, Kazuhiro Kogure, Akira Yokota. 2010. *Psychrosphaera saromensis* gen. nov., sp. nov., within the family Pseudalteromonadaceae, isolated from Lake Saroma Japan. The Journal of General and Applied Microbiology. 56(6): 475-480. (査読有)
3. Park, Sanghwa, Susumu Yoshizawa, Kazuhiro Kogure, Akira Yokota. 2011. *Rubicoccus marinus* gen. nov., sp. nov., of the family 'Rhodothermaceae', isolated from seawater. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 61:2069-2072. (査読有)
4. Chiura, Hiroshi X., Kazuhiro Kogure, Sylvia Hagemann, Adolf Ellinger and Branko

Velimirov. 2011. Evidence for particle-induced horizontal gene transfer and serial transduction between bacteria. FEMS Microbiology Ecology 76: 576-591. (査読有)

5. Sanghwa Park, Susumu Yoshizawa, Kazuhiro Kogure and Akira Yokota. 2011. *Oceanicoccus sagamiensis* gen. nov., sp. nov., a gamma-proteobacterium isolated from sea water of Sagami Bay in Japan. The Journal of Microbiology. 49(2): 233-237. (査読有)
6. Yoshizawa Susumu, Akira Kawanabe, Hiroyasu Ito, Hideki Kandori and Kazuhiro Kogure. 2012. Diversity and functional analysis of proteorhodopsin in marine *Flavobacteria*. Environmental Microbiology. 14 (5): 1240-1248. (doi:10.1111/j.1462-2920.2012.02702.x) (査読有)
7. Yamada, Keisuke, Akira Kawanabe, Susumu Yoshizawa, Kentaro Inoue, Kazuhiro Kogure, Hideki Kandori. 2012. Anomalous pH effect of blue proteorhodopsin. The Journal of Physical Chemistry Letters. 3 (7): 800-804. (Manuscript ID: jz-2012-000257.R1) (査読有)
8. Park, Sanghwa, Susumu Yoshizawa, Kentaro Inomata, Kazuhiro Kogure and Akira Yokota. 2012. *Aureitalea marina* gen. nov., sp. nov., a member of the family Flavobacteriaceae, isolated from seawater. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 62: 912-916. (査読有)
9. Yoshizawa, Susumu, Yasuhiro Tsuruya, Youhei Fukui, Tomoo Sawabe, Akira Yokota, Kazuhiro Kogure, Melissa Higgins, Jeremy Carson, Fabiano L. Thompson. 2012. *Vibrio jasicida* sp. nov., a member of the Harveyi clade, from marine animals (packhorse lobster, abalone, and Atlantic salmon). International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 62:1864-1870. (査読有)
10. Yoshizawa, Susumu, Hajime Karatani, Minoru Wada, Kazuhiro Kogure. 2012. *Vibrio azureus* emits blue-shifted light via an accessory blue fluorescent protein. FEMS Microbiology Letters. 329 (1): 61-68. (査読有)
11. Park, Sanghwa, Susumu Yoshizawa, Kentaro Inomata, Kazuhiro Kogure and

Akira Yokota 2012. *Halioglobus japonicus* gen. nov., sp. nov., and *Halioglobus pacificus* sp. nov., within the class Gammaproteobacteria, isolated from seawater. International Journal of Systematics and Evolutionary Microbiology. Doi: 10.1099/ijs.0.031443-0 (in press) (査読有) .

究員

研究者番号：なし

P12404 (学振、外国人特別研究員番号)

[学会発表] (計 6 件)

1. Yoshizawa, Susumu, Akira Kawanabe, Hideki Kandori, and Kazuhiro Kogure. Proteorhodopsin is functioning as the light-driven proton pump among marine Flavobacteria. International Society for Microbial Ecology, 13 International Symposium, at Seattle, USA, August 18, 2010.
2. Kogure Kazuhiro. Proteorhodopsin, a new mechanism to harvest light energy. At National Institute of Oceanography, Goa, India, Sept. 16, 2010.
3. Kogure Kazuhiro. Exploring marine microbial unknown functions. At Fu Jen Catholic University, Taipei, Taiwan, June 21, 2011
4. 木暮一啓. VNC の概念の変遷と新たな展開. 日本生化学会 2011 年度大会、京都国際会議場, 京都、10 月 21 日、2011
5. Kogure Kazuhiro. “Photoheterotrophy” -an overlooked mechanism of marine bacteria. At National Central University, Chung-Li City, Taiwan, Dec.1, 2011.
6. Kogure Kazuhiro. “Photoheterotrophy” -an overlooked new mechanism in marine environments. At ASLO Presymposium, Otsu, Japan, March 5, 2012.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木暮 一啓 (KAZUHIRO KOGURE)
東京大学・大気海洋研究所・教授
研究者番号：10161895

(2) 研究分担者

浜崎 恒二 (KOJI HAMASAKI)
東京大学・大気海洋研究所・准教授
研究者番号：80277871

吉澤 晋 (SUSUMU YOSHIZAWA)
東京大学・大気海洋研究所・特任研究員
研究者番号：00553108

(3) 研究協力者

朴相和 (PARK SANGHWA)
東京大学・大気海洋研究所・農学特定研