

## 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 5 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22710004

研究課題名（和文）海洋細菌がもつプロテオドプシンの光受容による地球規模炭素循環の支配

研究課題名（英文）Proteorhodopsin-mediated phototrophy controls global carbon cycle

研究代表者

吉澤 晋（SUSUMU YOSHIKAWA）

東京大学・大気海洋研究所・特任研究員

研究者番号：00553108

研究成果の概要（和文）：

本研究では、2000年に海洋細菌から見つかった光駆動型プロトンポンプであるプロテオロドプシン（以下PR）の生物機能を、分離培養株を用いて詳細に解析し、PRのプロトン排出速度および利用波長領域を明らかにすることに成功した。従来、PR遺伝子を持つ細菌は難培養性であると考えられてきたが、本研究で多数の分離培養に成功した。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we aimed to reveal the biological function of proteorhodopsin (PR), which was discovered in 2000, by using our recent PR-containing isolates. As a result, we succeeded in the quantification of light-driven proton pump activity of PR and the measurement of usable wavelength ranges of PR. Furthermore, many PR-containing bacteria, which have been known as "hard to cultivate", were successfully isolated.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境動態解析

キーワード：プロテオロドプシン、光従属栄養、Flavobacteria、物質循環、海洋、微生物

## 1. 研究開始当初の背景

ごく近年まで、光をエネルギー源とする海洋表層の生物はクロロフィルを持つ酸素発生型の光合成生物と考えられてきたが、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プロテオロドプシン(PR)と命名された。プロテオロドプシンはオプシ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。この反応はクロロフィル系とは異なる光エネルギーの利用様式として注目されている。

その後の研究から、海洋環境中からPRの相当遺伝子配列が続々と見つかり、海洋細菌の数十%がこの遺伝子を保持すると推定されている。特に、外洋のような貧栄養環境ではPRが細菌のエネルギー流に大きく寄与し

ていると考えられている。しかし PR 遺伝子を持つ細菌は“極めて難培養性であり”、これまでに細菌分離株は7種、9株しかなく、さらにその中で光による増殖促進が明瞭に観察されているものはわずか1株のみである。このように、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ため、PR が生態系のエネルギー流や炭素循環において果たす役割はほとんど分かっていない

## 2. 研究の目的

本研究は応募者が既に保持している PR を持つ分離株（新規分離株 5 2）および研究航海で新たに分離した PR 保持細菌のプロトンポンプ機能の詳細な解析を行い、PR が地球規模炭素循環にどの程度寄与しているのかを解明する事を目的としている。

## 3. 研究の方法

本研究では具体的に以下の課題を遂行した。

### (1) 海洋地球研究船「みらい」による PR 保持細菌の分離

平成 22 年度に実施された研究航海で、西部北太平洋亜寒帯および亜熱帯海域から PR 保持細菌の分離を試みた。PR 遺伝子の検出には、遺伝子データベースを用いて新規に設計した複数のプローブを用いた。

### (2) PR 分離株を用いたプロトンポンプ活性の測定

PR 保持分離株のプロトンポンプ活性を測定する実験系を名古屋工業大学と共同で構築し、プロトンポンプ活性の測定を行った。プロトンポンプ活性の測定は、照射光によって細胞内から放出される微量プロトン量を解析する。その為、培地 pH の変化を高感度で測定することにより行った。

具体的には、細胞内から排出される微量プロトンを検出する為に、高感度 pH メータを用いた。

### (3) PR の利用波長の解析

上記課題に用いたプロトンポンプ活性測定装置の光源に光学フィルターを設置することで、特定波長における PR のポンプ活性を測定し、PR の作用スペクトルを算出した。

### (4) PR プロトンポンプ活性の定量化

PR のプロトン排出作用による培地 pH の変化を詳細に解析すること、および細胞内に存在する PR タンパク質量を分光学的手法を駆使して測定することを行い、1PR タンパク質が1分間に排出するプロトン量の定量化を行った。

## 4. 研究成果

みらい航海 (MR10-01) において、亜熱帯海域から 78 株、亜寒帯海域から 72 株の海洋細菌を分離し、PR 遺伝子の有無を調べた。その

結果、合計 28 株から PR 遺伝子の検出に成功した。これまでの研究で得た株と総合すると、合計 74 株の PR 保持細菌を得た事になる。これまでに PR 遺伝子を持つ細菌の報告例は 20 株に満たない事から、我々が持つ PR 保持細菌ストックは世界一である。

名古屋工業大学と共同で構築した PR のプロトンポンプ活性測定装置を用いて、PR 遺伝子を持つ生菌からプロトンポンプ活性を測定する事に世界で初めて成功した。これまで PR の活性は遺伝子組み換え大腸菌でしか測定されたことがなく、本研究で得られた成果は海洋環境中での PR の役割を理解する上で重要な知見を与えるものである。また、作用スペクトルの解析の結果から、520-540nm の範囲の光を利用していることも明らかになった。

プロトンポンプ活性の定量化実験から、Winogradskyella 属の PG-2 株では、1分間に1つの PR タンパク質が約 125 個のプロトンを排出することが明らかとなった。また、この株 1細胞当たり約 16,000 個の PR タンパク質が存在した。

本研究で、世界で初めて PR のプロトンポンプ活性の定量化に成功した。仮にこれまでの研究で算出した値 (1PR 当りのプロトン放出数 125 H<sup>+</sup>/PR/min、1細胞当りの PR 量 16000 個) を用いて、PR を通して海洋生態系に流れ込む太陽エネルギー量を以下の仮定を用いて計算すると、「仮定 1. 有光層内の海洋細菌の約 1割が PR を持つ」、「2. グルコース 1分子の分解で 100 個のプロトンを排出する」、「3. 細菌生産が 0.1-5.0 ugC/L/d」、「4. 細菌増殖効率が 0.1」。細菌が呼吸で得るエネルギーの 15-0.3% に相当するエネルギーを PR が太陽光から受け取っていると見積もれる。今後さらに複数の株、複数の培養条件で PR のポンプ活性を定量化することで、さらに高精度で PR を通して流れ込む太陽光エネルギー量の算出ができると期待できる。

## 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] (11 件)

- ① Sanghwa Park, Susumu Yoshizawa, Kentaro Inomata, Kazuhiro Kogure, and Akira Yokota. (in press) *Halioglobus japonicus* gen. nov., sp. nov., and *Halioglobus pacificus* sp. nov., within the class Gammaproteobacteria, isolated from seawater. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* doi: 10.1099/ij.s.0.031443-0. 査読有
- ② Susumu Yoshizawa, Yasuhiro Tsuruya,

- Youhei Fukui, Tomoo Sawabe, Akira Yokota, Kazuhiro Kogure, Melissa Higgins, Jeremy Carson and Fabiano L. Thompson. (in press) *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* doi: 10.1099/ijs.0.025916-0. 査読有
- ③ Sanghwa Park, 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. doi: 10.1099/ijs.0.031450-0. 査読有
- ④ Susumu Yoshizawa, Hajime Karatani, Minoru Wada, and Kazuhiro Kogure. (2012) *Vibrio azureus* emits blue-shifted light via an accessory blue fluorescent protein. *FEMS microbiology letters* 329, 61-68. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2012.02507.x. 査読有
- ⑤ Susumu Yoshizawa, Akira Kawanabe, Hiroyasu Ito, Hideki Kandori, and Kazuhiro Kogure (2012) Diversity and functional analysis of proteorhodopsin in marine Flavobacteria. *Environmental Microbiology* 14, 1240-1248. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2012.02702.x. 査読有
- ⑥ Keisuke Yamada, Akira Kawanabe, Susumu Yoshizawa, Kentaro Inoue, Kazuhiro Kogure, and Hideki Kandori (2012), Anomalous pH Effect of Blue Proteorhodopsin. *The Journal of Physical Chemistry Letters* 3, 800-804. DOI: 10.1021/jz3000257. 査読有
- ⑦ Sanghwa Park, Susumu Yoshizawa, Kazuhiro Kogure and 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. doi: 10.1099/ijs.0.026294-0. 査読有
- ⑧ 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, 233-237. DOI: 10.1007/s12275-011-0368-y. 査読有
- ⑨ Susumu Yoshizawa, 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, 499-507. <http://dx.doi.org/10.2323/jgam.56.499>. 査読有
- ⑩ Susumu Yoshizawa, Hajime Karatani, Minoru Wada, Akira Yokota, and Kazuhiro Kogure. (2010) *Aliivibrio sifiae* sp. nov., luminous marine bacteria isolated from seawater. *The Journal of General and Applied Microbiology* 56, 509-518. <http://dx.doi.org/10.2323/jgam.56.509>. 査読有
- ⑪ Sanghwa Park, Susumu Yoshizawa, Koji Hamasaki, Kazuhiro Kogure and Akira Yokota. (2010) *Psychrosphaera saromensis* gen. nov., sp. nov., within the family Pseudoalteromonadaceae, isolated from Lake Saroma, Japan. *The Journal of General and Applied Microbiology* 56, 475-480. <http://dx.doi.org/10.2323/jgam.56.475>. 査読有
- [学会発表] (計 12 件)
- ① Susumu YOSHIZAWA, Proteorhodopsin-mediated phototrophy in marine Flavobacteria. The 3rd AORI-KIOS Joint Symposium on Marine Science. Kashiwa, Japan. Oct. 10, 2011.
- ② Susumu YOSHIZAWA, Can you answer this question in your own words? "Why are you interested in the matter?" THE 3rd KOREA-JAPAN SYMPOSIUM ON MICROBIAL ECOLOGY. Gwangju, Korea. May. 13, 2011
- ③ Susumu Yoshizawa, Wada Minoru and Kazuhiro Kogure, VARIATION OF EMISSION SPECTRA OF MARINE LUMINOUS BACTERIA, 13th International Society for Microbial Ecology. Seattle, USA. Aug. 26, 2010.
- ④ Susumu Yoshizawa, Akira Kawanabe, Hideki Kandori, and Kazuhiro Kogure, PROTEORHODOPSIN IS FUNCTIONING AS THE

LIGHT-DRIVEN PROTON PUMP AMONG MARINE FLAVOBACTERIA, 13th International Society for Microbial Ecology. Seattle, USA. Aug. 26, 2010.

- ⑤ Susumu Yoshizawa, Akira Kawanabe, Hideki Kandori, and Kazuhiro Kogure, PROTEORHODOPSIN FUNCTIONS AS THE LIGHT-DRIVEN PROTON PUMP AMONG MARINE FLAVOBACTERIA. 1C-10, 第26回日本微生物生態学会. つくば. Nov. 24, 2010.
- ⑥ 吉澤 晋, 川鍋 陽, 伊藤 洋康, 神取 秀樹, 木暮 一啓, 海洋性フラボバクテリアのプロテオロドプシンによる光エネルギー利用, 第27回日本微生物生態学会. 京都. Oct. 6, 2011.
- ⑦ 千浦 博, 吉澤 晋, 木暮 一啓, 極海洋から分離された Polaribacter の広宿主域遺伝子伝達粒子, 第27回日本微生物生態学会. 京都. Oct. 6, 2011.
- ⑧ 吉澤 晋・木暮一啓, プロテオロドプシン、新たな光利用メカニズム. 2nd Forum of Network association of Microbiologist in Ehime (NAME). 愛媛. Nov. 26, 2011.
- ⑨ Kentaro Inoue, Keigo Watanabe, Susumu Yoshizawa and Kazuhiro Kogure, Distribution and diversity of haloarchaea in marine environments. P11, 第26回日本微生物生態学会. つくば. Nov. 24, 2010.
- ⑩ 猪又 健太郎・吉澤 晋・木暮 一啓, Polaribacter 属細菌の分類に関する研究, P-125, 第26回日本微生物生態学会. つくば. Nov. 24, 2010.

[その他]

プレスリリース (2012年2月16日)  
<http://www.aori.u-tokyo.ac.jp/research/news/2012/20120216.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・特任研究員  
研究者番号: 00553108