

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 17 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24657013

研究課題名(和文)発光細菌は何色に光るのか？発光色を通じて解明する、発光細菌の光利用生態！

研究課題名(英文)What color do luminous bacteria emit? The analysis of emission colors could tell us their light-use ecology

研究代表者

吉澤 晋(yoshizawa, susumu)

東京大学・大気海洋研究所・研究員

研究者番号：00553108

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、様々な海洋環境から分離した発光細菌の発光色を詳細に調べ、発光細菌発光色の生態学的意義の解明を目指した。発光色を調べた結果、発光細菌の放つ光の色は単一ではなく、複数のバリエーションがあることが分かった。また、極大波長が480 nm以下の発光色を持つ株は細胞内に発光色を変化させる蛍光タンパク質を持つことが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to evaluate the ecological significance of bacterial bioluminescence based on the analysis of light emission spectra shed by luminous bacteria isolated from various marine environments. Our data revealed that light emission spectra do not have the same shape, but display a few variations. In addition, our analyses showed that the bacterial strains with shorter maximum wavelength light emission (approximately <480 nm) have a lumazine protein, which is the substance responsible for modulating light emission spectra.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・生態・環境

キーワード：進化生態 発光生物 海洋細菌 ルシフェラーゼ 蛍光タンパク質

1. 研究開始当初の背景

発光細菌は、沿岸から外洋の海水などから広く分離される、一方で海洋中に無数に漂うマリンスノー（海中懸濁物：主に海産生物の糞や死骸から構成される）の約70%が発光細菌の活動により発光している事が報告されており、発光細菌の生態とどの様に関係しているのかが注目されている(Andrews et al., 1984)。本研究では、「発光細菌はマリンスノー上で発光することにより高次生物（魚等）に認識・捕食され、腸管内で増殖しそのニッチを維持している」という仮説を立て、その検証を発光細菌の発光色を用いて行う挑戦的な試みである。その根拠は以下の3つである。

1. 発光色は海洋中での光の透過効率を決定する因子である。
2. 細胞内蛍光タンパク質（青色蛍光タンパク質 [Lumazine protein]: 発光色を短波長側にシフトさせる）が3種の発光細菌から見つかったが、その生態学的意義は全く分かっていない。
3. 発光細菌は海水中よりも魚の腸管内や体表等に遥かに多く生息することが知られている。

つまり、発光細菌は長い進化の歴史の中で、生息環境に特化した発光色が高次生物によって選択されてきた可能性があり、発光色を詳細に解析することで彼らの光利用生態が明らかになると考えられる。

2. 研究の目的

発光細菌は、主に海洋に生息し光を放つ細菌の一群である。その発光色は多少の違いはあれど人間の目には青緑色として認識される範疇に入り、それほどどのバリエーションがあるとは考えられていない。しかしながら、発光色は海水中での光の透過率を決定する最大の因子であり多少の違いでも光の到達距離に大きな影響を及ぼす。本研究では、これまで謎にまつまれてきた発光細菌の光利用生態を、発光色という斬新な切り口から追求し、「生息海域に応じて発光細菌発光色はどの程度異なるか？」また「発光色はどのような進化の歴史を辿ってきたのか？」を分光学的および分子生物学的な手法を用いて詳細に解き明かし、「発光色を基礎とする発光細菌の光利用生態」という新しい概念の提唱を最大の目的とする。

3. 研究の方法

これまでの研究から分離に成功した約1500株の発光細菌を用いて以下の課題を実施した。

- (1) 発光色のバリエーションはどの程度あるか？

発光細菌の発光色を分光光度計（励起光源をOFFにして用いて）で、nmオーダーで詳細に測定した。具体的には、Marine agar上で培養した発光細菌を24~48時間培養し、発光色を測定した。測定中の発光強度増減による誤差を無くすために、培養は寒天培地でおこなった。温度は一律20とし、温度による影響を無くした状態で発光色の比較を行った。

(2) 発光色と生息環境の関係

課題(1)で明らかとなる発光色のデータと、発光細菌の分離源の環境パラメータ（クロロフィル濃度、温度、塩分、深度等）を総合的に解析し、発光色に高い相関性のあるパラメータの決定を行った。

(3) 発光酵素（ルシフェラーゼ）遺伝子と発光色の関係

この課題は、重要な未解明問題の1つであるルシフェラーゼ遺伝子と発光色の関係を分子生物学的手法を用いて検証するために行った。具体的にはルシフェラーゼのサブユニット遺伝子(*luxA*)の塩基配列を決定し、発光細菌の*luxA*系統樹と発光色の関係の解析を行った。

4. 研究成果

これまでの研究で沿岸や外洋から分離した発光細菌を16S rRNAを用いて種の推定を行った結果、全ての分離株は*Vibrio*属、*Photobacterium*属、*Aliivibrio*属に含まれることが分かった。また発光色を測定し解析した結果、発光細菌の発光色は単一ではないこと、各属に特有の発光色を持つことを示した。具体的には*Vibrio*属発光細菌の発光色は473 nmおよび482 nmに単一のピークを持つ2つのグループに分けられること、*Photobacterium*属では479 nmおよび488 nm、*Aliivibrio*属では485 nmおよび535 nmにピークを持つ2つのグループに分けられた。これまでに*Photobacterium leiognathi*、*Photobacterium phosphoreum* および*Aliivibrio sifiae*の3種においては、細胞内蛍光タンパク質を持つ株が報告されており、これらの株ではルシフェラーゼ反応に蛍光タンパク質が関与することで光の色を変化させることが知られている。本研究の発光色の測定から、新たに4種において蛍光タンパク質が存在する可能性が示唆された。発光色と生息環境の関係を調べた結果、*Vibrio*属、*Photobacterium*属においては短波長側にピークを持つ光を放つ株は、沿岸域よりも外洋域から多く分離される傾向が示された。また*Aliivibrio*属発光細菌は全て沿岸域から分離され、外洋域からは見つからなかった。ルシフェラーゼ遺伝子の系統関係と発光色を比較した結果、*P. leiognathi*を除いて、種内で単一の発光色を持つ可能性が示され

た。具体的には *Vibrio campbellii* と推定された株は 482 nm にピークを持つ光を放ち、*Vibrio azureus* と推定された株は 473 nm にピークを持つ光を放つことが示された。これまで発光細菌の放つ光の色は網羅的に測定されたことはなく、発光色は種に特有なのか、株によって異なるのか等の基本的な事柄も分かっていなかった。本成果により、発光細菌は種に特有の発光色を持つことが示唆された。

本研究で、発光細菌の発光色は単一ではなく各属に特有の発光色を持つこと、発光を変化させる細胞内蛍光タンパク質はこれまで考えられていた以上に多くの種を持つことが示された。また、発光細菌の発光色は生息環境に応じて異なる可能性が示唆された。外洋環境に生息する発光細菌が沿岸域のものよりも短波長に発光のピークを持つことは、生息環境における光の透過効率の違いが考えられる。有機物等の微小粒子が多く存在する沿岸では、短波長にピークを持つ光(約 470 nm) は散乱され、長波長にピークを持つ光(490 nm)の方が遠方まで届くことが知られている。また微小粒子量が少ない外洋環境では、470 nm にピークを持つ光の方が遠方まで届く。このことから、発光細菌の放つ光の色は、生息環境に応じて選択されてきた可能性が示唆される。今後、現在実施中のゲノムシーケンスのデータ解析からルシフェラーゼ遺伝子や蛍光タンパク質の進化過程を推定することで、発光細菌発光色の多様化メカニズムの詳細を解析し、発光色を基礎とする発光細菌の光利用生態という概念を提唱することが可能であると考えられる。

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2件)

Sanghwa Park, Jaeho Song, Susumu Yoshizawa, Ayoung Choi, Jang-Cheon Cho and Kazuhiro Kogure, 査読有, (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, 査読有, (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

〔学会発表〕(計7件)

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, 第29回日本微生物生態学会, 鹿児島, Nov. 23-35, 2014.

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.

Susumu Yoshizawa, Proteorhodopsin-mediated phototrophy in marine Flavobacteria, CREST International Workshop on Aquatic Microbial Ecology, Kashiwa-campus of The University of Tokyo, Japan. Jul. 6, 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.

吉澤晋, クロロフィルとロドプシンの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, 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.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕 出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:

国内外の別：

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