

南極の微生物が極限環境の中で生き抜く戦略の一端を解明

～生態系のエネルギー循環を担うロドプシンの生物学的意義の解明に貢献～

ポイント

- ・ 光受容体タンパク質の一種であるロドプシンの機能と、細菌の光応答性を結びつけることに成功。
- ・ 低温環境に適応したイオン輸送機能が、極限環境での生命活動を支えていることを解明。
- ・ 第二の光合成とも呼ばれるロドプシンの生物学的及び生態学的役割のさらなる解明に期待。

概要

北海道大学大学院先端生命科学研究院の塚本 卓助教らの研究グループは、南極にすむ細菌が、プロテオロドプシンと呼ばれる光受容体タンパク質を介して極限環境の中を生き抜く仕組みの一端を明らかにしました。また、それは低温環境に適応したプロテオロドプシンの機能によって支えられていることを明らかにしました。

2000年に海洋細菌から発見されたプロテオロドプシンは、現在までに地球上の様々な環境に生息する細菌に多数分布していることが確認されており、植物の光合成と並んで生態系のエネルギー循環を担う分子として生態学的な重要性が広く認識されています。しかし、ほとんどの天然の細菌はそもそも実験室で培養することが極めて困難であり、そのため、天然の細菌がプロテオロドプシンを介して実際にどのように光を利用しているのかを実験によって示した例は少ない状況でした。

そこで本研究では、プロテオロドプシンを持ち、実験室で培養可能な南極の赤雪由来の好冷性細菌 *Hymenobacter nivalis* P3^T (これ以降、*H. nivalis*) を用いて、光で活性化するプロテオロドプシンの機能と *H. nivalis* の光応答性を結びつけ、*H. nivalis* の光利用の実態を実験によって示すことを試みました。その結果、*H. nivalis* は光を受けるとプロテオロドプシンを介して細胞の内外にプロトン駆動力を作り、それを使ってアデノシン三リン酸 (ATP) が合成され、作られた ATP が *H. nivalis* の細胞増殖に使われるという一連の生物応答を、実験によって示すことに成功しました。さらに、南極の低温環境に適応した *H. nivalis* のプロテオロドプシンの機能を明らかにしました。

なお、本研究成果は、2024年9月17日(火)公開の *Biochemistry* 誌に掲載されました。



南極の赤雪から単離した好冷菌 *Hymenobacter nivalis* P3^T を試験管で培養したあとの様子

【背景】

地球上のほぼ全ての生物は、太陽からの光の影響を受けて生きています。しかし、個々の生物がどのように光を利用しているのか、その戦略には多くの謎が存在します。こうした地球上における生物の光利用戦略を理解するために、研究グループはその基盤となる分子レベルの研究を行ってきました。

生物は、太陽から降り注ぐ光を情報やエネルギーに変換して利用しています。光をエネルギーとして利用する例は、植物の光合成が代表的です。しかし、2000年以降、遺伝子解析技術の飛躍的な発展と、それを用いた大規模な遺伝子解析により、プロテオロドプシン (PR) と呼ばれる光受容体タンパク質が地球上のあらゆる環境にすむ細菌から多数発見され、光合成と並んで光エネルギー変換を担い、生態系のエネルギー循環に寄与する分子として、その生態学的な重要性が認識されてきました。

PRは光を受けて活性化すると、細菌の細胞の外側に水素イオン (H^+) を汲み出します。これにより、細胞内外に H^+ の濃度勾配 (正しくは、電気化学ポテンシャル勾配) が作られます。 H^+ 濃度勾配は、他の様々なタンパク質の機能を駆動する力 (H^+ 駆動力) となり、その一つが生命のエネルギー通貨と呼ばれているアデノシン三リン酸 (ATP) の合成反応です。このように光を使って ATP を合成する PR の役割は、光合成とは全く異なる光エネルギー変換の仕組みです。

一方、天然の細菌が PR を介して、実際にどのように光を利用しているのかを実験によって示した例は、意外にも少ない状況です。その背景には、ほとんどの細菌がそもそも実験室で培養することが極めて難しいことが理由として挙げられます。そこで研究グループは今回、PR を持ち、実験室で安定して培養できる天然の細菌として、南極の赤雪から単離した好冷菌 *Hymenobacter nivalis* P3^T に着目しました (P1 図)。本研究では、PR の機能と細菌の細胞応答を結びつけることを目的に、*H. nivalis* の PR (HnPR と略) の光照射による H^+ 駆動力の生成 (H^+ 輸送活性測定)、細胞内 ATP 合成、光照射下での細胞増殖について波長依存性^{*1} を調べ、HnPR の吸光特性 (吸収スペクトル^{*2}、図 4) との一致性を確かめました。

【研究手法・研究成果】

本研究では、まず初めに *H. nivalis* を培養し、pH 電極法^{*3} (図 5) によって *H. nivalis* に発現している HnPR の細胞外向き H^+ 輸送活性を測定しました (図 1A)。*H. nivalis* の懸濁液に pH 電極を挿入し、光を当てた時の懸濁液の pH 低下を測定しました。その結果、光を当てると懸濁液の pH が低下し、HnPR による細胞外向き H^+ 輸送活性を確認しました。また、当てる光の波長 (色) (505 nm (青緑色)、530 nm (緑色)、590 nm (オレンジ色)) によって、活性の強さが変化しました。

次に、一般的な ATP の発光定量法を用いて、*H. nivalis* の細胞内 ATP 量を測定しました (図 1B)。その結果、光照射によって ATP 量が増えることに加え、当てる光の波長によって ATP 量に差が見られました。

最後に、濁度法により、*H. nivalis* の細胞増殖を測定しました (図 1C)。その結果、培養日数に対する濁度は図 1C のように変化し、光照射下では増殖が速くなること、さらに当てる光の波長によって、増殖の速さに差が見られました。

以上の三つの実験結果を、それぞれ光照射前からの変化量に直し、HnPR の吸収スペクトルと重ね合わせました。その結果、細胞外向き H^+ 輸送活性 (図 1D)、細胞内 ATP の増加量 (図 1E)、増殖の加速 (図 1F) が、吸収スペクトルとよく一致しました。したがって、これら三つは HnPR の分子機能に結びついていると言えます。以上より、*H. nivalis* は光を受けると HnPR を介して H^+ 駆動力を作り、ATP 合成酵素がそれを使って ATP を合成し、できた ATP が細胞の増殖に使われるという一連の生物応答を、実験によって示すことができました (図 2)。

H. nivalis は HnPR を発現しています。そこで、*H. nivalis* の細胞膜片を精製して、その中に含まれている

天然の HnPR の光化学反応⁴を、フラッシュフォトリシス法⁵を用いて調べました。この方法では、光化学反応が進む中で、特定の波長の光を吸収する反応中間体の生成と崩壊の様子を観測します。図 3 は 5°C で測定した結果です。HnPR の光反応自体は、これまでよく研究されてきた PR と大きな違いはありませんでしたが、5°C の低温条件においても 0.3 秒で終わるくらいの速い光反応を示すことが分かりました。ロドプシンの光反応が低温で遅くなることを考慮すると、この結果は HnPR が南極の低温環境でも、十分に速く機能する H⁺輸送タンパク質であることを意味しています。

【今後への期待】

2000 年に最初の PR が発見されて以来、新しいロドプシンの探索研究が盛んに行われてきました。対照的に、2000 年以前のようなロドプシンの生物学的役割を明らかにするための天然宿主を用いた研究は明らかに減少しています。本研究は、HnPR の分子機能と天然宿主である *H. nivalis* の光依存的な生物応答との関連を実験的に示すことに成功し、生態系のエネルギー循環の具体例を示すことができたと考えています。天然宿主を用いた研究は遺伝子組換え生物を使った研究に比べて難しいですが、それでも天然宿主を用いなければ得られない知見はまだ多く残されています。

【謝辞】

北海道大学大学院理学研究院の山本宏子技術専門職員の技術協力及び共用施設の使用に感謝いたします。また本研究は、北海道大学ダイバーシティ・インクルージョン推進本部よりいただいた、2021 年度前期「研究活動とライフイベントの両立のための補助人材支援」の支援を受けて実施されました。

論文情報

| | |
|-----|--|
| 論文名 | Contribution of Proteorhodopsin to Light-Dependent Biological Responses in <i>Hymenobacter nivalis</i> P3 ^T Isolated from Red Snow in Antarctica (南極の赤雪から単離された <i>Hymenobacter nivalis</i> P3 ^T における光依存的な生物応答に対するプロテオロドプシンの寄与) |
| 著者名 | 近藤香織 ¹ 、大竹峻平 ¹ 、中野隼佑 ¹ 、寺島美亜 ² 、小島久弥 ² 、福井 学 ² 、出村 誠 ³ 、菊川峰志 ³ 、塚本 卓 ³ (¹ 北海道大学大学院生命科学院ソフトマター専攻、 ² 北海道大学低温科学研究所、 ³ 北海道大学大学院先端生命科学研究院) |
| 雑誌名 | Biochemistry (アメリカ化学会の専門誌) |
| DOI | 10.1021/acs.biochem.4c00286 |
| 公表日 | 2024 年 9 月 17 日 (火) |

お問い合わせ先

北海道大学大学院先端生命科学研究院 助教 塚本 卓 (つかもとたかし)

T E L 011-706-4475 メール t-tak@sci.hokudai.ac.jp

U R L <https://altair.sci.hokudai.ac.jp/infana/>

配信元

北海道大学社会共創部広報課 (〒060-0808 札幌市北区北 8 条西 5 丁目)

T E L 011-706-2610 F A X 011-706-2092 メール jp-press@general.hokudai.ac.jp

【参考図】

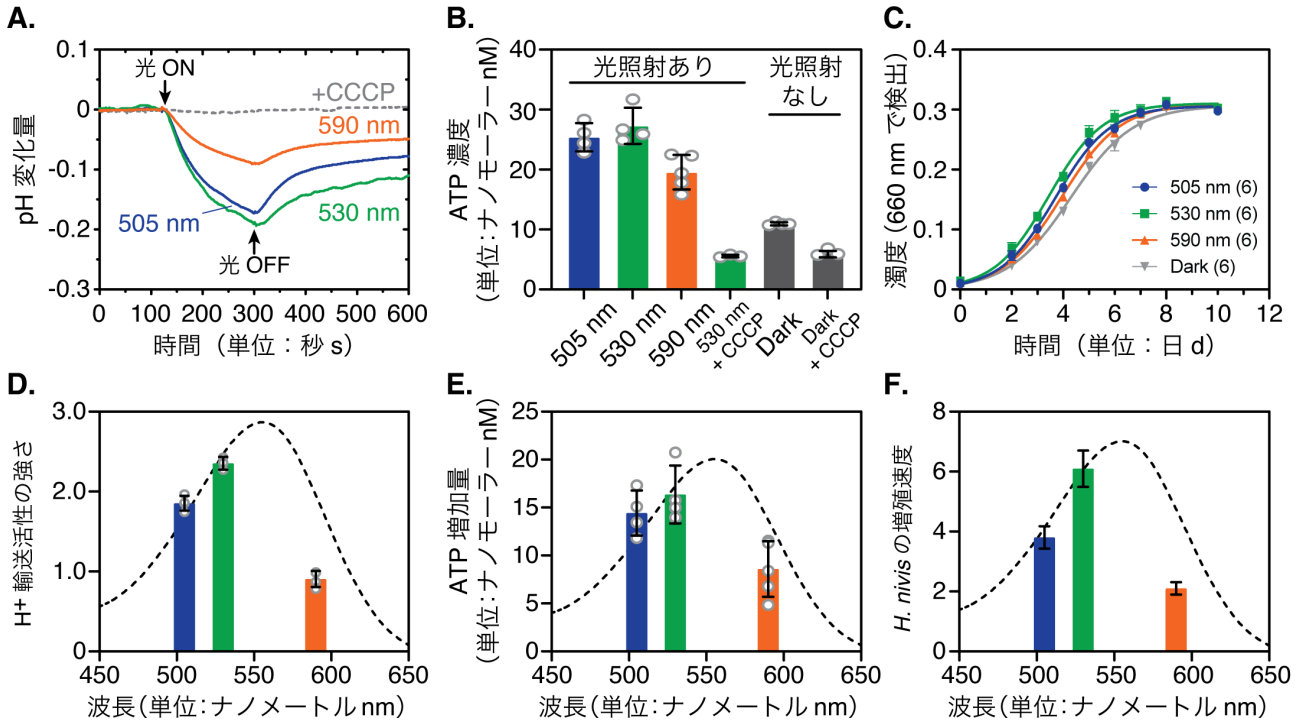


図 1. *H. nivalis* の光依存的な生物応答

(A) HnPR の H⁺ 輸送活性、(B) *H. nivalis* 細胞内の ATP 量、(C) *H. nivalis* の増殖、
 (D – F) (A – C) の変化量 (棒グラフ) と HnPR の吸収スペクトル (点線) の重ね合わせ

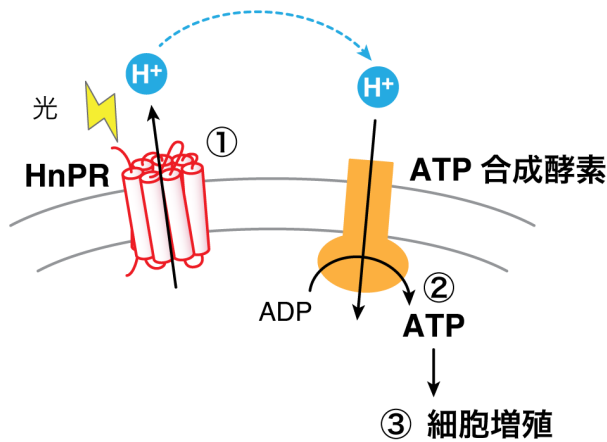


図 2. *H. nivalis* の光依存的な生物応答に対する HnPR の役割

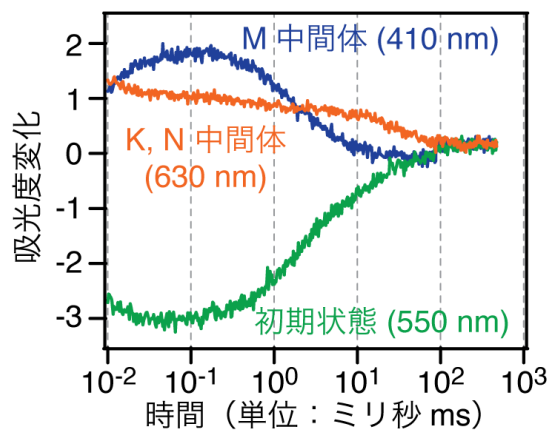


図 3. *H. nivalis* 細胞膜中の HnPR の光化学反応、5°C の低温条件でも約 0.3 秒で反応が終了する

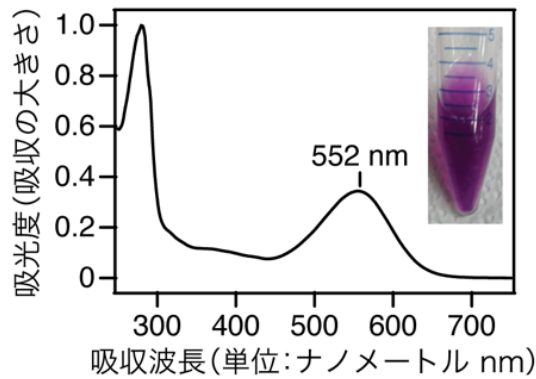


図 4. 遺伝子組換えによって発現・精製した HnPR の吸収スペクトル

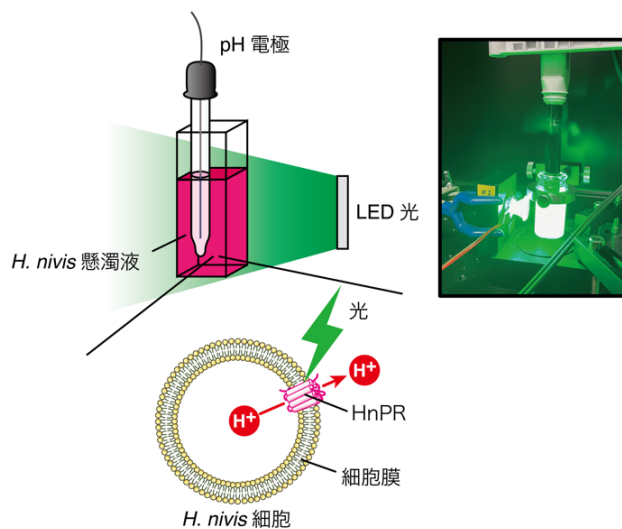


図 5. pH 電極法の概要

【用語解説】

- *1 波長依存性 … 照射する光の波長（色）に対して、測定値が変化すること。本研究では、照射する光の波長（505 nm（青緑色）、530 nm（緑色）、590 nm（オレンジ色））を変えて、3種類の測定（ H^+ 輸送活性、細胞内 ATP 合成、細胞増殖）を行った。
- *2 吸収スペクトル … どの波長（色）の光をどのくらい強く吸収するかを示した分布図のこと。図 4 は精製した HnPR の吸収スペクトルを示す。
- *3 pH 電極法 … pH 電極を使って、イオン輸送活性を測定する方法（図 5）。この方法では、*H. nivalis* を NaCl 水溶液に懸濁し、pH 電極を挿入する。光を当てて HnPR が活性化すると、HnPR を通して *H. nivalis* の細胞内側から細胞外側へ H^+ が流出する。その結果、懸濁液の pH の低下が起こる。
- *4 HnPR（ロドプシン）の光化学反応 … ロドプシンは、七回膜貫通 α ヘリックスからなるタンパク質部分と、光を受容する補因子レチナールから構成されている。光で活性化するとレチナールの異性化（all-*trans*→13-*cis*）が起こり、タンパク質部分の構造変化を伴って K、L、M、N、O と呼ばれる光反応中間体を逐次的に生成・崩壊する。その後、レチナールの再異性化（13-*cis*→all-*trans*）を伴って初期状態へ回復する。この一連の光化学反応をフォトサイクルと呼ぶ。ロドプシンは、フォトサイクルの間に個々の機能を発現する。
- *5 フラッシュフォトリシス法 … 高速で進行する光化学反応を追跡・分析する方法。過渡吸収分光法とも呼ばれる。ロドプシンでは、光化学反応が進む中で、特定の波長の光を吸収する反応中間体が生成・崩壊する。フラッシュフォトリシスでは、その様子を観測する。