变形菌视紫质——海洋光能生物利用的新途径

焦念志　冯福应　魏 博

(厦门大学近海海洋环境国家重点实验室, 厦门 361005. E-mail: jiao@xmu.edu.cn)

摘要　海洋环境基因组研究的突破揭示出海洋细菌中存在可利用光能的视紫质——变形菌视紫质(PR). 基因及其蛋白序列分析和激光诱导光解实验等证明PR属于质子泵型视紫质, PR将光能转化成细胞膜内外质子梯度化学势能, 并用于合成ATP. PR的发现揭示了海洋中存在与依赖于叶绿素进行光合作用完全不同的光能生物利用的新途径. 已有研究表明PR细菌是地球上最丰富的生物之一. 表层海水中PR细菌约占总细菌数量的 13%, 而每个细胞中PR的平均分子数约为 2.5×10^4个. 显然, PR在海洋能量代谢以及碳循环中的作用不可忽视. 基于对国外研究的认识和我们对中国海PR研究的结果, 提出了海洋生态系统中的包括光合色素途径和非光合色素途径的能流和碳循环模型.

关键词　变形菌视紫质**(proteorhodopsin)**　光合作用　海洋微型生物　质子泵　碳循环模型

海洋是地球光合作用的发源地. 通常认为, 海洋中光能的生物利用是通过光合色素叶进行光合作用来实现的. 这些色素包括人们熟知的正常叶绿素(chlorophyll)、罕见的二乙烯基叶绿素(divinyl chlorophyll)以及细菌叶绿素(bacterial chlorophyll), 他们分别存在于产氧的真核藻类(eukaryotic algae)、产氧的原核蓝细菌(cyanobacteria)以及不产氧光合异养细菌(phototrophic bacteria)[1]. 然而, 近年来基于太平洋环境基因组文库的研究首次揭示了海洋中尚存在非经典光合作用的新途径——变形菌视紫质(proteorhodopsin, PR). PR可直接利用光能来驱动质子流出细胞质膜外, 形成膜内外的质子梯度势, 并利用质子梯度势合成细胞能量"流通货币"ATP[2], 从而完成由光能向化学能的转化. 对PR蛋白结构、光谱学特性和光化学反应的研究确证了PR的光合功能[3]. 由于海洋真光层含PR的细菌数量丰富, 可占总微生物数量的13%之多[4], PR所介导的新形式光合作用必然在海洋生态系统的物质和能量循环中占有不可忽视的地位. 这种直接获取光能的新式光合作用的存在, 使得我们必须重新审视和修改食物网和能流模型(http://www.mbari.org/news/news_releases/2002/feb07_delong.html).

本文分析了目前国外研究进展, 并结合我们自己的研究结果对 PR 分布、基因遗传多样性、结构和功能, 及其在海洋生态系统中的作用进行了探讨, 在此基础上, 提出海洋生态系统中的光能利用途径和碳循环模型.

1　海洋变形菌视紫质的发现及与其他视紫质在功能上的异同

自然界中, 从古菌到高等动物中都有视紫质(rhodopsin)(retinylidene proteins, 视黄醛蛋白)的存在[5]. 所有视紫质都具有类似的拓扑结构, 即均由 7 个跨膜α-螺旋组成, 在这些螺旋围成的囊中结合有发色团——视黄醛; 不同之处是这些螺旋在细胞质膜上的相对位置会有差异. 自然界中已发现的视紫质, 可根据蛋白序列的相似程度区分为Type Ⅰ和Type Ⅱ两类. Type Ⅰ, 即微生物型(或称古菌类似型), 存在于低等的微生物中; Type Ⅱ, 即动物视网膜型, 存在于高等的真核生物中. 后者主要发现于动物的视网膜上, 可感受光信号[5].

微生物中的视紫质, 是 20 世纪 70 年代首先在极端嗜盐古菌中*Halobacterium salinarum*中发现的. 此后陆续在与*H. salinarum*相关的一些古菌中也发现了视紫质的存在. 在证明微生物中含有视紫质后的 30 年中, 有关研究都基本集中在古菌方面. 已知的古菌视紫质有两类: 离子泵型和感光型. 因所转运的离子不同, 离子泵型包括了质子泵(bacteriorhodopsin, BR)和氯离子泵(halorhodopsin, HR)视紫质两类. 根据序列和光谱特性的差异, 将感光型视紫质区分为感光型Ⅰ(sensor Ⅰ, SR Ⅰ)和Ⅱ型 (sensor Ⅱ, SR Ⅱ). BR和HR光吸收最大波长约在 570 nm处. 在光驱动下, BR将H^+运出膜外, 形成膜内外的质子梯度势, ATP合成酶利用此梯度势合成ATP, 为细胞提供能量. HR则在

光驱动下将Cl^-泵入膜内, 保证细胞的pH平衡, 以使其适应极端生存环境. BR是所有视紫质中研究最多的, 更是为数不多的得到了晶体结构的膜蛋白之一. 在BR全长 248 氨基酸残基中的功能位点已经基本清楚, 包括视黄醛和Schiff碱基结合位点、质子化和去质子化氨基酸残基等[5,6]. SR Ⅰ和Ⅱ分别具有黄光和绿光趋向的光信号感应作用, SR Ⅰ还有对紫外光的趋离感应, 使细胞避免受到紫外线的伤害. 视紫质所有这些作用的发挥是由于光可引起其构象发生变化, 产生一系列的中间态并可再回到初始态完成光化学循环, 此过程中将离子泵入(出)或传递光信号[6,7].

最近研究表明, 含有视紫质的微生物并非只有嗜盐古菌. 从 1999 年开始, 随着实验室内可培养微生物的基因组测序工作的开展, 在细菌和真核生物中也发现了古菌视紫质的同系物[8~10]. 不过, 序列特征以及光化学循环过程分析说明, 这些微生物中的视紫质主要是感光型的,并不是质子泵型视紫质, 因而不能利用光能进行光合作用为细胞提供能量[11]. 最近的研究表明, 真菌*Leptosphaeria maculans*中发现的视紫质也属于质子泵型的, 可利用光能合成ATP[12]. 而通过构建海洋环境样品的细菌人工染色体文库(bacterial artificial chromosome library, BAC)[13] 所进行的环境基因组测序工作使得Béjà等人[2]从蒙特里湾(Monterey Bay)的海洋细菌中首次发现了古菌BR的同系物. 科研工作者们将这条可能的视紫质基因在大肠杆菌中的进行了表达, 其表达产物与另外加入的视黄醛结合使得大肠杆菌细胞呈现红色, 说明加入的视黄醛与表达产物相结合, 进一步在激光诱导光解实验中表现出与BR类似的快速光化学循环过程(< 20 ms)[14]. 在光解实验中还检测到了质子从细胞质膜内向膜外泵出. 所有的实验强有力地证明了这条海洋细菌中新发现的序列是编码质子泵型视紫质的. 幸运的是, 含这条视紫质序列的克隆BAC31A08 的基因大片段恰巧包含了部分编码核糖体小亚基序列, 对这段 16S rDNA分析表明, 此视紫质基因克隆来自变形菌SAR86 类群. 于是, Béjà等人[2]将海洋中此新发现的视紫质命名为变形菌视紫质(proteorhodopsin, PR). 另外, 2001 年Béjà等人[15]通过收集大量海洋细菌环境样品的细胞膜进行的激光诱导光解实验更进一步证明了PR在自然环境中真实存在.

微生物的视紫质(type Ⅰ)的保守残基, 特别是形成与视黄醛结合的"囊"的残基明显地有别于来自高等生物中视紫质(type Ⅱ)相应区域. Type Ⅰ型视紫质在 3 个生物域即古菌、细菌和真核生物均存在,说明视紫质介导的光能利用形式可能比其他的光合作用形式在地球上出现的更早[11].

2 PR 在海洋中的分布和遗传多样性

继蒙特里湾环境基因组分析首次确定了质子泵型视紫质在海洋变形菌中的存在之后, 更多海域的环境基因组文库以及应用PCR方法对PR的扩增研究表明, PR 具有丰富的遗传多样性. 目前, 已报道和提交 GenBank 中的 PR 序列已有 900 条之多. 其中的一些质子泵功能得到了实验确证, 但绝大多数序列的质子泵功能未经过实验证实. 这些序列的对应于质子泵功能相关的关键位点上的保守氨基酸与BAC31A08相同, 说明这些序列应该是行使光能驱动质子泵功能的视紫质.

2.1 PR 在海洋中的分布

目前, 已报道PR存在的海域有美国加利福尼亚蒙特里湾、太平洋夏威夷时间序列站(Hawaii Ocean-Time Station, HOT station)、红海、地中海、马尾藻海和南极边缘海域[4]. 这些海区除蒙特里湾外都是贫营养环境, PR在其他类型营养环境的分布情况尚知之甚少. 自 2003 年起, 我们进行了中国南海、东海和渤海及近岸(图 1)不同生态环境、不同水深中PR的多样性研究. 采样范围从河口受冲淡水影响的低盐度海水到外海高盐度海水、从表层到深水; 从清洁的外海到污染比较严重的近海、港口乃至对虾养殖池. 通过应用已报道引物[2]和自己设计的引物对上述环境样品的DNA的PCR扩增, 发现在所有的被检测样品中均有PR序列的存在. 理论上, PR细菌具有利用光能来补充其异养代谢的功能, 贫营养环境应是其优势生态灶. 而我们的研究结果表明, 含PR细菌适应的海洋环境极为广泛, 也暗示了PR细菌可能的高生物多样性. 特别是我们的研究发现, 具有PR的细菌分布可深达无光的 500 m处, 远远超出了以前报道的 100 m的分布深度(仍然有光). PR在无光深水中的存在突破了PR细菌与光关联的认识框架. 这一点得到了他人最新实验研究结果的证实. 例如, Giovannoni等人[16]对目前惟一培养菌株*Pelagibacter ubique* HTCC1062 的光照培养的实验研究发现, 该菌在黑暗条件下依然正常生长并表达PR蛋白. 序列比对(图 2)

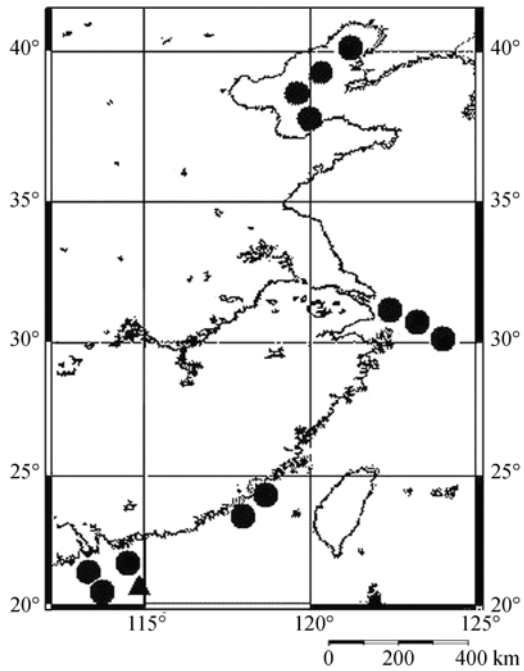


图 1　中国海变形菌视紫质调查站位分布

▲为垂直站，采样水层分别为 0, 400 和 500 m. ●为表层站位

和系统发育分析(图 3)显示出我们获得序列是属于SAR86-Ⅰ型和 *α-proteobacterium* 两个主要类群. 而 *Pelagibacter ubique* 正是属于 *α-proteobacterium* 的SAR11 类群.

2.2　PR 的遗传多样性

虽然通过环境基因组和PCR的方法人们已认识了多达 900 个PR序列，但对PR多样性的了解尚处于起步阶段. DNA序列比对发现，不同地理和生态环境下的PR基因同源性有所差异，它们在系统进化树中的位置也有所不同[17]，这表明环境调控和自然选择对PR在起作用[18]. 更多的PR多样性的研究可能会揭示其进化历史和在不同生物域中的分化时间. 环境基因组测序使人们第一次认识了海洋中的视紫质PR，基于这条首次发现的PR序列设计PCR引物应用到了PR的多样性研究中. 然而，随后环境基因组测序的深入开展揭示PR的变异甚大，最初设计的引物并不能将所有序列包括进去. 2004 年，Venter等人[19]在对马尾藻海环境基因组文库分析中就发现了

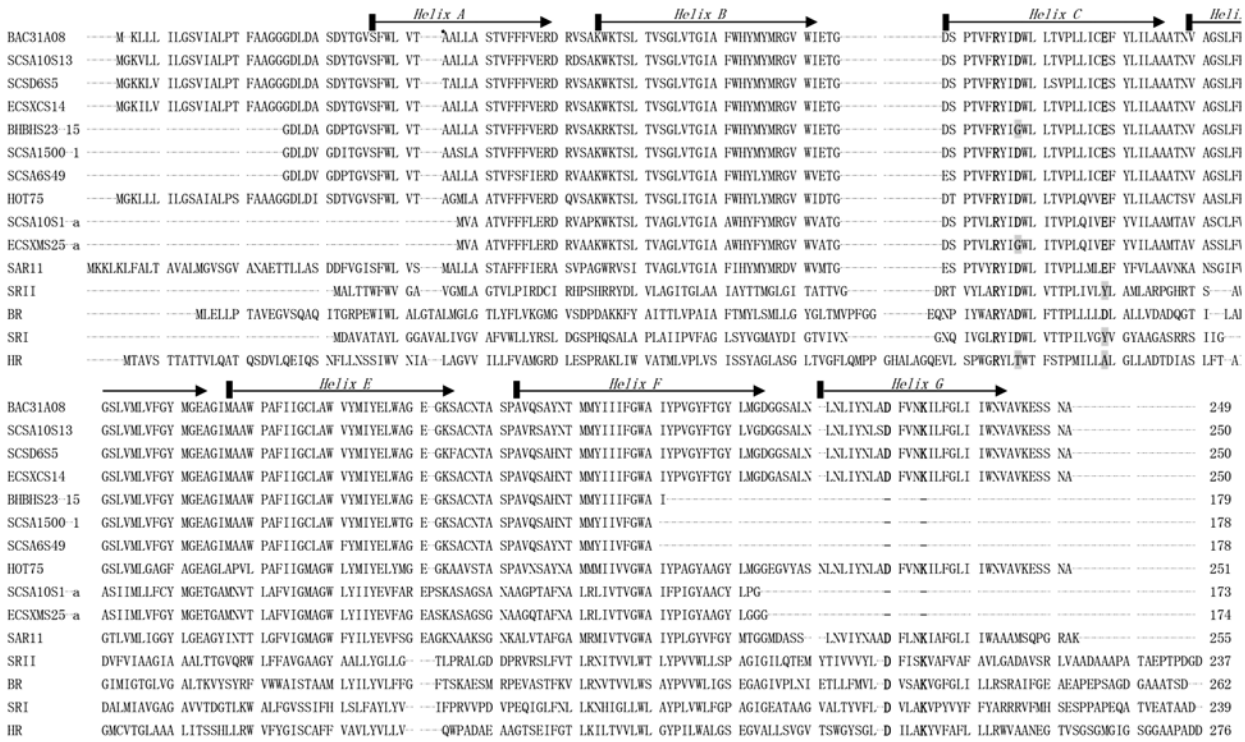


图 2　中国海变形菌视紫质与其他海区变形菌视紫质的序列比对

BR, *Halobacterium salinarum* 菌紫质; SR Ⅰ, *H. salinarum* 感光视紫质Ⅰ; SR Ⅱ, *H. salinarum* 感光视紫质 Ⅱ. 其余均为变形菌视紫质: BAC31A08 来自 Monterey Bay 湾，为蓝光型; HOT75 来自太平洋 HOT 站 75 m 深海水，为绿光型; SAR11 来自培养菌株 *P. ubique* HTCC1062; 其他来自中国海.图中关键的活性位点以黑体标出，这些位点中不同残基以灰色背景区别. 比对用 ClUSTALX (1.81)软件完成，并经过人工核对

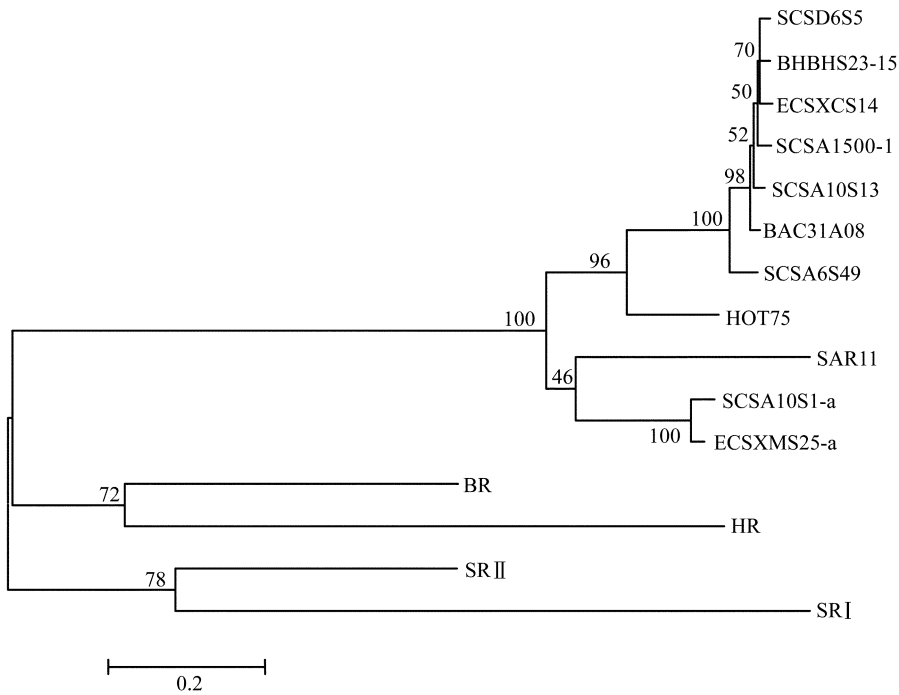


图 3 中国海变形菌视紫质与其他海区变形菌视紫质的系统发育地位比较(Neighbor-joining 系统树)

利用 ClUSTALX (1.81)进行序列比对, 利用 MEGA3 进行 Neighbor-joining 树构建; 图中标尺代表每个位点的替代数(0.2 即表示每 100 个氨基酸中有 20 个替代); 树的拓扑结构可靠性进行了 100 次自展重复检验, 自展值列于枝上. BR 为 *Halobacterium salinarum* 菌紫质; SR Ⅰ为 *H. salinarum* 感光视紫质 Ⅰ; SR Ⅱ为 *H. salinarum* 感光视紫质 Ⅱ. 其余均为变形菌视紫质: BAC31A08 来自 Monterey Bay 湾, 为蓝光型; HOT75 来自太平洋 HOT 站 75 m 深海水, 为绿光型; SAR11 来自培养菌株 *Pelagibacter ubique* HTCC1062; 其他均来自中国海

782 条与以前所报道的差异明显的PR序列. 建立在对已有序列分析基础上的PCR方法是研究基因遗传多样性中应用最广泛的方法. 所以, 在应用PCR方法研究PR多样性时, 重新设计引物是必要的. 这样可能会发现更多差异明显的序列, 促进人们对这一领域的认识和理解. 我们的相关研究工作中部分使用了自己设计的引物, 其中包括专门针对α变形菌PR的特异引物. 蛋白序列比对(图 2)表明, 来自中国海的序列与已知的PR序列同样具有 7 个α螺旋结构域, 其中Helix C和Helix G中的关键活性位点保守域RXXD(X代表任意氨基酸)和DXXXK存在. 值得注意的是, 我们获得的来自中国海的 2 个序列(BHBH23-15 和ECSXMS25-a)中, 保守域RXXD中并没有Asp85 而是被Gly85(残基位置对应于BR)取代. 虽然Asp85 的存在并非认定质子泵视紫质的充分条件, 但Asp85 是成为质子泵视紫质的必要条件[11,20]. 在系统进化树(图 3)中BHBH23-15, ECSXMS25-a和海洋细菌PR聚在一起, 说明他们之间有更接近的亲缘关系, 但Gly与羰基型氨基酸Asp相比缺少一个COO^-基团, 很可能最终影响蛋白构象, 这与现已报道的质子泵型的PR存在关键性的不同. 所以并不能肯定这两个序列就是质子泵型PR. 但是, 联系到发现新序列的海域污染相对较重, 这些序列是否是为光合细菌提供耐抗环境污染相关的功能(利用光能产ATP应对逆境), 抑或此类关键位点突变是受到污染物诱变导致, 对这些疑问的回答尚有待于进一步深入研究.

另外, BAC31A08 与HOT75 在第 93 个氨基酸残基位点(位置对应于BR序列)上L和Q差异, 即Leu93和Gln93 的不同, 导致这 2 个序列形成的蛋白在其生物细胞中对光的最大吸收波长有明显的差异; 它们之间的存在~22%的差异, 分别来自 2 个进化分支[15].

2.3 含 PR 的细菌物种多样性

含有视紫质的海洋细菌种类可能远比以前估计

的要多，除了在海洋蓝细菌中的存在感光型视紫质[21]以及变形菌中有PR之外[2,16]，海洋细菌的另一大类非变形菌 Cytophaga-Flavobacterium-Bacteriodes (CFB)中也发现了视紫质基因同系物的存在[19]. 但这些CFB中的同系物的功能尚不清楚，且无证据表明自然环境下这些基因是否表达. 而PR在SAR86 中的存在及其质子泵功能已得到实验数据的充分支持[2]. Sabehi等人[22]进一步研究指出，PR在不同的SAR86亚类SAR86-Ⅰ，Ⅱ，Ⅲa和Ⅲb中有分布，并指出在SAR86 类群中的PR和其 16S rRNA的进化是不平行的. 最先报道的在BAC31A08 中的PR属于SAR86Ⅱ，是目前研究的最多和最全面的一类PR. 在分析太平洋海洋细菌基因组文库HOT2C01(含PR的基因组片段)时，Torre等人[21]发现其中含有α变形菌核糖体编码基因序列. 而α变形菌在海洋中是生物数量最丰富的细菌. 但由于所发现的这段序列较短且没有与其序列关系密切的培养菌株，所以还不能对此含PR的α变形菌进行确切分类. 类似地，马尾藻海的环境基因组测序发现了许多差异大的PR同系物，这些序列很可能来自不同的微生物，这预示着PR可能分布于更多样的海洋细菌中. 我们的研究结果显示，PR细菌在中国海有广泛的分布，但基于 16S rDNA的中国南海和东海的细菌组成分析并未发现SAR86 类群的存在，而有SAR86 系统关系相近的大量SAR11 变形菌存在. SAR86 和SAR11 都非常难于在实验室条件下培养. 所幸*P. ubique* HTCC1062 已培养成功(是目前惟一能培养成功的海洋PR细菌)[23]，其体积只有约 0.01 μm^3，在现有培养细菌中是最小的. 对*P. ubique*的全基因组进行测序分析发现，*P. ubique*拥有着最为简约的基因组结构，是目前获得全基因组信息的浮游微生物中基因组最小的一株. 对该 SAR11 菌株进行蛋白组学的分析表明，它含有与BAC31A08 中的PR同源性达49.4%的蛋白[16,24]. 我们的序列比对(图 2)表明此蛋白具有所有质子泵型PR的特征.

3 不同光谱类型 PR 的特征及其变化原因

来自表层和深层海水PR序列特征有所差异. PR基因在大肠杆菌细胞中表达后的产物再与视黄醛结合后形成可以运输质子的活性蛋白. 从PR活性蛋白光谱特性来看，已知PR主要有 3 类，即绿光型PR(GPR)、蓝光型PR(BPR)和蓝绿光型PR(B-G-PR). 不同光谱类型的PR在海水中的分布情况与深度相关，是对其所处自然环境光谱的适应[15]. 不同光谱类型PR的最大吸收波长λ_{max}有所变化主要是由于蛋白序列中第 65, 70 和 105 氨基酸残基突变而引起吸收光谱的红移或蓝移所致.

GPR在海洋PR中是最先被发现的. 在已知PR中占绝大多数，现有的GPR类型发现于光照充分的太平洋、地中海等表层海水中. 分离纯化的含活性GPR的光谱特征研究显示其对绿光有最大吸收，吸收波长λ_{max}为 525 nm. 而BPR和B-G-PR的λ_{max}分别为 490 和 515 nm[25~27]. 在蒙特里湾表层海水中发现的BAC31A08 克隆中，GPR蛋白序列中位于第 65, 70 和 105 位上的氨基酸残基分别为Ser, Gly和Leu; 而来自太平洋HOT站 75 m深处以及北冰洋表层海水的BPR，在相应位置上的氨基酸残基分别为Ser, Gly和Gln. 可见，GPR和BPR光谱特性的差异主要是第105位上Leu和Gln的不同引起的. 而来自红海 100 m深层海水的B-G-PR 的Gln105 是与BPR相同的，其λ_{max}应在490~500 nm之间; 然而其在第 65 和 70 位上的氨基酸残基分别是Pro和Asp，而不是分别对应于GPR和BPR中的Ser和Gly. B-G-PR中的Pro65 和Asp70 导致了B-G-PR最大吸收的红移，最终Pro65, Asp70和Gln105相互作用下使得B-G-PR的λ_{max}为 515 nm[27]. 这些特定位点氨基酸残基变化对吸收光谱的影响作用均得到了基因定点突变实验的支持.

虽然不同光谱类型的PR的吸收光谱特性存在差异，但是激光诱导光解实验结果表明，GPR和BPR是质子泵型的PR，而B-G-PR是否质子泵型的PR还有待进一步的研究. 通过最大吸收波长的激光诱导可引起PR光化学反应，此反应类似BR的光反应过程，是一个周而复始的循环过程. 测定反应循环过程中间体的时间分辨吸收光谱，可了解不同中间体光谱特性，确定不同的中间体以及它们出现的间隔时间. GPR和BPR完成光化学循环时间<20 ms，这是离子泵型视紫质典型的光循环特征; 相比之下，感光型视紫质的光循环的半周期一般>300 ms[7]. 虽然B-G-PR在大肠杆菌细胞中表达活性蛋白可以运输质子，但激光光解实验表明其光循环时间在现有的PR中是最长的(半周期>600 ms). 以前的研究表明，SRⅡ在缺少信号共转导分子的情况下可以运输质子[28,29]，而B-G-PR在大肠杆菌中表达显然也缺少了可能的信号转导分子. 长的光循环时间使得B-G-PR是质子泵抑或是感光型PR出现了疑问. 但如果B-G-PR在自然

界中确实是质子泵型PR, 那么它具有较长光循环时间的合理解释应该是其对所处的自然环境光密度和光谱特性适应的结果[11]. 类似地, 我们在没有光的500 m深层水样品中扩增得到的PR序列在决定吸收光谱峰位的基本氨基酸残基和B31A08 相同, 由此推测其最大光吸收波长可能应该在 525 nm处. 对此结果有以下几种可能的解释: (ⅰ) 这些序列感光型PR存在其他明显影响最大吸收波长的氨基酸残基, 其功能可能与细菌的避光行为有关; (ⅱ) PR作为细菌的辅助的产能手段, 一些细菌中可能存在不表达具有活性的PR, 这些基因属于"沉默"基因; (ⅲ) 可能像在动物大脑中发现的目前仍不清楚功能的视紫质, 海洋中的PR也许还具有目前不为人知的除感光和运输离子之外的其他功能. 所有这些问题只有通过进一步研究甚至是在相应的菌株在实验室培养成功后方能彻底解决.

4 PR 的生态学意义

已有研究表明, PR存在于α和γ变形菌以及CFB等丰度大、分布广的海洋细菌类群. 从环境基因组分析推测, 含PR的海洋细菌在所有海洋细菌中占的比例可达 13%[4]. 如果假设只有SAR86 含有PR, 估 算每个细菌细胞含有 2.4×10^4个PR分子[15]. 若按Michel等人[30]和Tsutomu等人[31]的报道推测, 如此多的PR分子将产生大量的ATP分子以补充细胞基本代谢所需. 而Giovannoni等人[16]的最新研究结果认为, 环境中每个PR浮游细菌至少含有 25000 个PR蛋白分子, 每个细胞中PR蛋白占胞膜内表面积的 20%. PR蛋白在自然环境中含量之大可见一斑. 尽管这类细菌极难培养, 目前尚没有专门的实验数据证明其能流规模, 但不难想见, PR 细菌对于海洋能流和碳循环的作用是不容忽视的.

海洋占地球表面积的 71%, 是地球上最大的碳库, 在全球的碳循环和能量流动中扮演着举足轻重的角色. 以往我们对海洋光合作用的认识主要是建立在光合色素叶绿素基础之上的. PR 的发现使我们认识到光能生物利用的一个新途径. 通过 PR 实现的不依赖于叶绿素的光能合成 ATP 形式突破了传统的光合作用概念, 并对基于叶绿素估计光合作用和初级生产力的理念提出了挑战.

综合人们对海洋光合作用的认识, 本文提出海洋光能生物利用与碳循环的框架模型(图 4). 在这个模型中, 海洋光能生物利用大致划分为 3 大途径: (ⅰ) 基于光合色素叶绿素的产氧光合作用途径, 由光合系统Ⅰ和光合系统Ⅱ组成, 可将光能转化为化学能并固碳(途径Ⅰ). 其承担者为海洋藻类/浮游植物(基于正常叶绿素)和蓝细菌(基于正常叶绿素和二乙烯基叶绿素). (ⅱ) 基于细菌叶绿素的不产氧光合作用途径, 该途径通常缺乏光合系统Ⅱ, 因而只能将光能转化为化学能但不能固碳. 其承担者为好氧光合细菌和厌氧光合细菌(途径Ⅱ). (ⅲ) 基于 PR 的光能利用途径, 该途径不具备正常的光合系统Ⅰ和Ⅱ, 而由 PR 直接捕获光能, 通过质子泵机制产生 ATP(途径Ⅲ). 这 3 种途径构成了海洋生物光能利用的主要驱动机制, 并在海洋能流和碳循环中发挥着不同的作用(图 4). 途径Ⅰ直接导致固碳, 途径Ⅱ和Ⅲ则通过产生 ATP 供细胞代谢或生长, 从而减少了由于呼

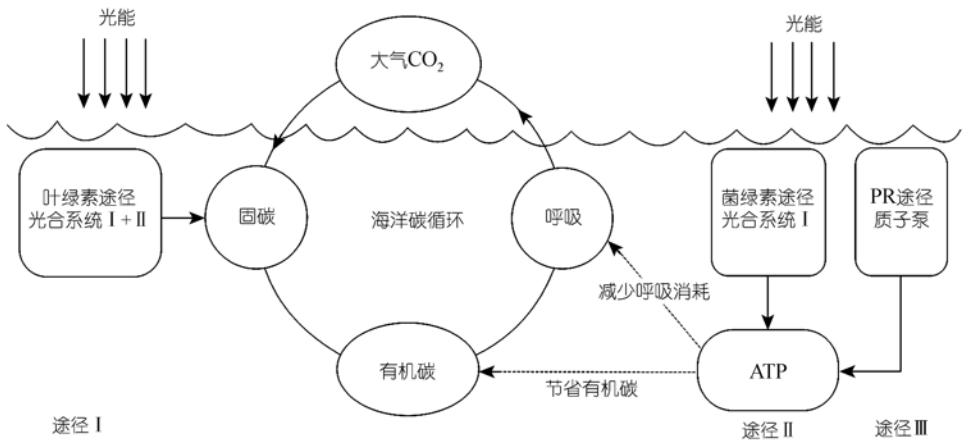


图 4 海洋中光能生物利用途径与碳循环模型

吸作用对有机碳的消耗, 间接地贡献于海洋固碳.

5 展望

迄今为止, 能进行实验室培养的细菌约占海洋细菌总数的 1%. 人们对细菌在海洋系统中的作用和功能的认识尚非常有限. 分子生物学技术的在海洋微生物研究的应用冲破了依赖于实验室培养方法的局限, 在探知海洋细菌的功能和作用特别是一些未知功能及其相关基因等研究过程中无疑是一个强大的工具和手段. 新近发展起来的环境基因组技术更是展现出巨大的优势. 以此为基础的研究为揭示海洋细菌未知功能做出了和正在做出重大贡献. 这方面的进展被*Science*评为 2004 年"十大科技突破"之一[32]. 正是因为海洋环境基因组测序工作才使得人们认识了海洋中的PR这一海洋光能生物利用新途径.

然而, 环境基因组技术也存在一些不足, 如不能很好地提供特殊功能基因来源的信息, 不能直接确定基因的原位生理生态功能等. 所以, 目前基于环境基因组和普通PCR方法还远未解决具有PR基因的海洋细菌群落结构组成的问题, 这一重要问题尚待利用和发展其他的实验方法如原位杂交等来进一步研究. 我们在这方面的研究和已有的初步结果显示, 其与环境基因组技术的互补优势, 可望在不久的将来有所突破. 与此同时, PR细菌的准确定量手段也是今后研究的一个重要方面. 正如另一类功能类群"好养不产氧光合异养菌"(AAPB)[33]的情况那样, 定量技术曾一度限制了人们对其在海洋环境中的分布格局的认识, 直到基于时间序列的红外荧光自动数字化显微技术(TIREM)问世才实现了AAPB的准确定量并对其随环境的变化有了真实的了解[34]. 图4中展示了PR在海洋生态系统和碳循环中重要作用的理论框架, 而对其作用量值的了解, 还有赖于准确的定量技术的建立.

另一方面, 实现 PR 海洋细菌的实验室人工培养是重要的和紧迫的, 只有获得了典型代表种, 才能通过实验来了解 PR 的真实光化学循环过程、明确不同 PR 是质子泵还是感光的原位功能、为其生理生态功能提供直接证据; 才能确定 PR 的光合作用量子效率、了解 PR 光合途径的开关调控机制、PR 光合和异养代谢的自控机制及其共存的协调机制, 从而确切评估其生理生态意义. 这方面, PR 细菌 *P. ubique* 的成功培养是一个好例, 对 *P. ubique* 的研究发现其拥有编码 20 种氨基酸生物合成、TCA循环等的全套基因[24], 为认识它在海洋物质循环中的作用提供了理论基础.

此外, PR的分布和多样性也有待更广泛深入的研究, 不仅是质子泵型PR, 感光型PR也具有重要研究价值. 例如, SR的信号转导机制可在信息技术方面大有用武之地, 光学信息处理和光储存、光控开关和光电探测、以及光滤过、光调制解调器和光晶体管等[35]. 总之, PR研究方兴未艾, 这方面的深入研究将使我们获得对海洋能流、物质循环的过程机制的新认识、将对学科发展起到推动作用, 并将为海洋微生物资源开发利用做出贡献.

致谢 本工作为国家自然科学基金(批准号: 40232021, 40576063 和 40521003)、国家重点基础研究发展规划(批准号: G2000078500 和 2001CB409700)和国家高技术研究发展计划(批准号: 2005AA635240)资助项目.

参 考 文 献

1 Fenchel T. Marine bugs and carbon flow. Science, 2001, 292: 2444—2445[DOI]
2 Béjà O, Koonin E V, Aravind L, et al. Bacterial rhodopsin: Evidence for a new type of phototrophy. Science, 2000, 289: 1902—1906[DOI]
3 Friedrich T, Geibel S, Kalmbach R, et al. Proteorhodopsin is a light-driven proton pump with variable vectoriality. J Mol Biol, 2002, 321: 821—838[DOI]
4 Sabehi G, Loy A, Jung K-H, et al. New insights into metabolic properties of marine bacteria encoding proteorhodopsins. PLoS Boil, 2005, 3(8): e273
5 Spudich J L, Yang C S, Jung K H, et al. Retinylidene proteins: structures and functions from archaea to humans. Annu Rev Cell Dev Biol, 2000, 16: 365—392[DOI]
6 Haupts U, Tittor J, Oesterhelt D. Closing in on bacteriorhodopsin: progress in understanding the molecule. Annu Rev Biophys Biomol Struct, 1999, 28: 367—399[DOI]
7 Bogomolni R A, Stoeckenius W, Szundi I, et al. Removal of transducer HtrI allows electrogenic proton translocation by sensory rhodopsin I. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91: 10188—10192
8 Bieszke J A, Braun E L, Bean L E, et al. The nop-1 gene of Neurospora crassa encodes a seven transmembrane helix retinal-binding protein homologous to archaeal rhodopsins. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96: 8034—8039[DOI]
9 Sineshchekov O A, Jung K H, Spudich J L. Two rhodopsins mediate phototaxis to low- and high-intensity light in *Chlamydomonas reinhardtii*. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99: 8689—8694
10 Jung K H, Trivedi V D, Spudich J L. Demonstration of a sensory rhodopsin in eubacteria. Mol Microbiol, 2003, 47: 1513—1522[DOI]
11 Spudich J L, Jung K H. Microbial rhodopsins: Phylogenetic and

functional diversity. In: Briggs W R, Spudich J L, eds. Handbook of Photosensory Receptors. Wiley Publisher Since USA, 2005. 1—23
12 Waschuk S A, Bezerra A G Jr, Shi L, et al. Leptosphaeria rhodopsin: Bacteriorhodopsin-like proton pump from a eukaryote. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102: 6879—6883[DOI]
13 Béjà O, Koonin E V, Aravind L, et al. Construction and analysis of bacterial artificial chromosome libraries from a marine microbial assemblage. Environ Microbiol, 2000, 2: 516—529[DOI]
14 Váró G, Brown L S, Lakatos M, et al. Characterization of the photochemical reaction cycle of proteorhodopsin. Biophysi, 2003, 84: 1202—1207
15 Béjà O, Aravind L, Eugene V, et al. Proteorhodopsin phototrophy in the ocean. Nature, 2001, 411: 786—789[DOI]
16 Giovannoni S J, Bibbs L, Cho J C, et al. Proteorhodopsin in the ubiquitous marine bacterium SAR11. Nature, 2005,438: 82—85[DOI]
17 Sabehi G, Massana R, Bielawski J P, et al. Novel proteorhodopsin variants from the Mediterranean and Red Seas. Environ Microbiol, 2003, 5: 812—849
18 Bielawski J P, Dunn K A, Sabehi G. Darwinian adaptation of proteorhodopsin to different light intensities in the marine environment. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101: 14824—14829[DOI]
19 Venter J C, Remington K, Heidelberg J F, et al. Environmental Genome Shotgun Sequencing of the Sargasso Sea. Science, 2004, 306: 66—74[DOI]
20 Kyndt J, Meyer T E, Cusanovich M A. Photoactive yellow protein bacteriophytochrome, and sensory rhodopsin in purple phototrophic bacteria. Photochem Photobiol Sci, 2004, 3: 519—530[DOI]
21 Torre J R, Christianson L M, Béjà O, et al. Proteorhodopsin genes are distributed in divergent marine bacterial taxa. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100: 12830—12835[DOI]
22 Sabehi G, Béjà O, Suzuki M T, et al. Different SAR86 subgroups harbour divergent proteorhodopsins. Environ Microbiol, 2004, 6: 903—910[DOI]
23 Rappé M S, Connon S A, Vergin K L, et al. Cultivation of the ubiquitous SAR11 marine bacterioplankton clade. Nature, 2002, 418: 630—633[DOI]
24 Giovannoni S J, Tripp H J, Givan S, et al. Genome streamlining in a cosmopolitan oceanic bacterium. Science, 2005, 309(5738): 1242—1245[DOI]
25 Man D, Wang W W, Sabehi G, et al. Diversification and spectral tuning in marine proteorhodopsins. EMBO J, 2003, 22: 1725—1731[DOI]
26 Wang W W, Sineshchekov O A, Spudich E N, et al. Spectroscopic and photochemical characterization of a deep ocean proteorhodopsin. J Biol Chem, 2003, 278: 33985—33991[DOI]
27 Man-Aharonovich D, Sabehi G, Sineshchekov O A, et al. Characterization of RS29, a blue-green proteorhodopsin variant from the Red Sea. Photochem Photobiol Sci, 2004, 3: 459—462[DOI]
28 Hoff W D, Jung K H, Spudich J L. Molecular mechanism of photosignaling by archaeal sensory rhodopsins. Annu Rev Biophys Biomol Struct, 1997, 26: 223—258[DOI]
29 Haupts U, Haupts C, Oesterhelt D. The photoreceptor sensory rhodopsin Ⅰ as a two-photon-driven proton pump. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92: 3834—3388
30 Michel H, Oesterhelt D. Electrochemical proton gradient across the cell membrane of *Halobacterium halobium*: Effect of N, N9-dicyclohexylcarbodiimide, relation to intracellular adenosine triphosphate, adenosine diphosphate, and phosphate concentration, and influence of the potassium gradient. Biochemistry, 1980, 19: 4607—4614[DOI]
31 Tsutomu M, Koichi K. Quantum conversion and image detection by a bacteriorhodopsin-based artificial photoreceptor. Science, 1992, 255: 342—344
32 Kennedy D. Breakthrough of the year. Science, 2004, 306: 2001[DOI]
33 焦念志, Sieracki M E, 张瑶, 等. 好氧不产氧光合异养细菌及其在海洋生态系统中的作用. 科学通报, 2003, 48(6): 530—534
34 Jiao N Z, Zhang Y, Chen Y. Time series observation based Infrared epifluorescence microscopic approach for accurate enumeration of bacteriochlorophyll containing microbes in Marine Environments. J Microbiol Methods, 2006, 64(3): 428—439
35 Hampp N, Oesterhelt D. Bacteriorhodopsin and its potential in technical applications. In: Niemeyer C, Mirkin C, eds. Nanobiotechnology. Weinheim: Wiley-VCH-Verlag, 2004. 146—167

(2005-11-08 收稿, 2006-03-01 接受)