

論文内容の要旨

論文題目 Analysis of a mutant collection by chlorophyll fluorescence kinetics

(クロロフィル蛍光を用いた遺伝子破壊株コレクションの解析)

氏名 尾崎 洋史

[序論]

現在までに約 300 の生物でゲノム配列が決定されているが、そのほとんどで、機能が分かっている遺伝子は半数程度にとどまる。遺伝子の機能推定に通常使われる方法のうち、配列の相同性から機能を推定する方法は、ゲノムワイドな適用が可能である一方、機能が既知の遺伝子と相同性を示さない場合には情報が得られず、また、タンパク質としての機能がわかった場合でも、生理的な役割が明らかになるとは限らないという欠点を持つ。一方、遺伝子破壊株の表現型解析による方法は、表現型を通して目的の遺伝子の生理機能を明らかにできる可能性を持つが、そもそも、どのような表現型を調べればよいのかわからない場合には適用できず、また、一般に大量解析には適さない。本研究においては、このような状況を克服すべく、クロロフィル(Chl)蛍光測定を用いた遺伝子機能解析の手法を考案した。近年、GFP などの蛍光プローブを用いた様々な解析方法が開発されている

カテゴリー	変異株の数	ゲノム上の遺伝子数	被覆率 (%)
Amino acid biosynthesis	16	97	16.5
Biosynthesis of cofactors, prosthetic groups, and carriers	21	124	16.9
Cell envelope	5	67	7.5
Cellular processes	20	78	25.6
Central intermediary metabolism	3	31	9.7
Energy metabolism	24	93	25.8
Fatty acid, phospholipid and sterol metabolism	8	39	20.5
Photosynthesis and respiration	28	142	19.7
Purines, pyrimidines, nucleosides, and nucleotides	5	41	12.2
Regulatory functions	35	146	24.0
DNA replication, restriction, modification, recombination, and repair	9	60	15.0
Transcription	6	30	20.0
Translation	27	168	16.1
Transport and binding proteins	33	196	16.8
Other categories	48	311	15.4
Hypothetical	147	1133	13.0
Unknown	65	508	12.8
合計	500	3264	15.3

表 1. 破壊株コレクションに含まれる破壊株の内訳

が、光合成生物は光合成色素という天然の蛍光プローブを持っている。Chl の蛍光は光合成の状態を反映する指標であり、光合成生物を暗順応させてから励起光を照射した場合の蛍光強度の経時変化は環境条件や光合成関連遺伝子の欠損に影響されることが知られている。本研究では、この Chl 蛍光測定を、原核生物であって光合成系が細胞内において他の代謝系と相互作用しうるシアノバクテリアに応用し、さらにトランスポゾンを利用した変異コスミドライブラリーによる遺伝子破壊株コレクションと組み合わせることにより、遺伝子の機能推定を行えるシステムの構築を目指した。

[結果と考察]

1. 破壊株コレクションの構築とChl蛍光挙動の測定と解析

東京大学、名古屋大学、京都大学の共同研究によって作成された変異コスミドライブラリーを用いて、500 株からなるシアノバクテリア遺伝子破壊株コレクションを構築した (表 1)。破壊された遺伝子は CyanoBase における 1st level のカテゴリーの全てにわたっており、ゲノム上の遺伝子の約 15%をカバーする。

OD₇₃₀ を 0.5 にそろえたシアノバクテリアの培養液 10 μ l を寒天培地に滴下し、強光 (200 μ E/m²/s) で 48 時間または弱光 (20 μ E/m²/s) で 72 時間培養後、細胞を 15 分間暗順応させてから励起光を照射し Chl 蛍光の経時変化を 45 秒間測定した。得られる蛍光データは細胞の状態を極めて鋭敏に反映する一方、異なる培養条件での比較は不可能に近い。そこで、以下の実験においては、各寒天培地に野生株を 5 スポット、4 種の破壊株をそれぞれ 5 スポット滴下し、破壊株の表現型は同一の培地上の野生株と比較することとし、各スポットから得られる 5 つの蛍光挙動のばらつきにより誤差を見積もった。

2. 光化学系量比調節に関わる遺伝子の探索と候補遺伝子破壊株の解析

Chl 蛍光挙動による遺伝子の機能解析の可能性を探るため、まず、光化学系量比調節に関わる因子の探索を行った。酸素発生型の光合成においては、光化学系 II と光化学系 I が協調して働くため、光環境に応じて 2 つの光化学系は適切な量比に調節される必要がある。

これまでに、この光化学系量比調節に強光下で欠損を示す遺伝子破壊株として *pmgA* 破壊株と *sll1961* 破壊株が報告されており、これらの破壊株は強光下でお互いによく似た Chl 蛍光挙動を示す。そこで、類似の機能に欠損のある遺伝子破壊株は類似の Chl 蛍光挙動を示すと仮定した。まず、*pmgA* 破壊株と *sll1961* 破壊株の Chl 蛍光挙動を測定したところ、強光培養時に、励起光の照射から約 0.5 秒後に現れる初期ピークが野生株よりも低く、45 秒後の蛍光レベルがそれらの初期ピークよりも高いという、共通する表現型を示した (図 1 B(1, 2))。そこで、この特徴を基準に

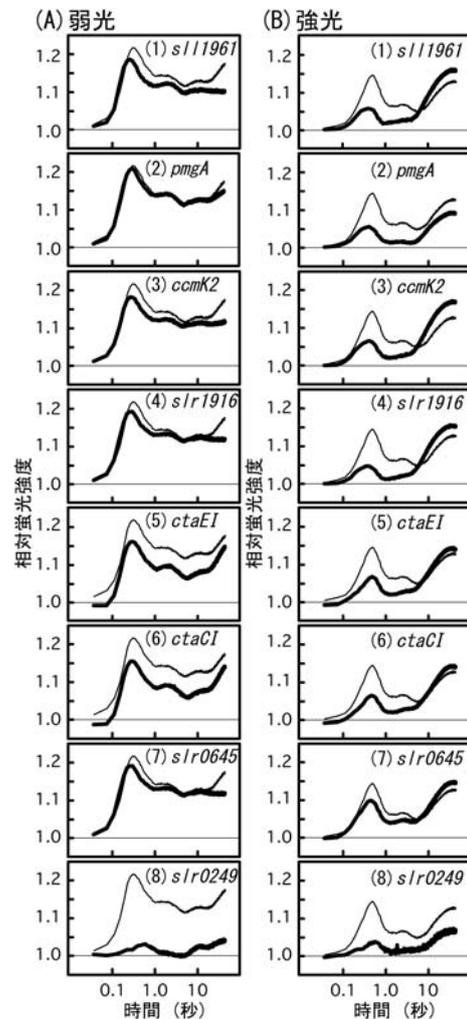


図1. 弱光(A)および強光(B)で生育させた野生株と *sll1961*, *pmgA*, *ccmK2*, *slr1916*, *ctaEI*, *ctaCI*, *slr0645*, *slr0249*破壊株の Chl 蛍光挙動

細線が野生株、太線が破壊株を示す。強光下でこれらの変異株はピークが野生株よりも低く、ピークより最終の点で蛍光強度が高い。蛍光強度は励起光照射時の値を 1 としている。

破壊株コレクションの中から蛍光挙動の類似した破壊株6種 (*ccmK2*, *slr1916*, *ctaEI*, *ctaCI*, *slr0645*, *slr0249*) を候補株として選抜した (図1 B(3-8))。これらの候補株の細胞の低温蛍光スペクトルを測定し、光化学系量比の指標となる光化学系 I (F_{725}) と光化学系 II (F_{695}) の蛍光強度の比を計算した。弱光に順化した各候補株は野生株と同様に F_{725}/F_{695} が2程度であったが、強光に順化した野生株では光化学系 I の減少に伴い F_{725}/F_{695} が1程度になるのに対して候補株では野生株よりも大きな値を示した (図2A)。

従って、これらの候補株は、実際に強光下での光化学系量比に異常を持つことが明らかとなった。このことは、Chl 蛍光挙動を単純に比較する方法で効率良く光化学系量比に異常がある破壊株をスクリーニングできることを意味する。

ctaEI, *ctaCI*は呼吸系の末端酸化酵素シトクロム *c* オキシダーゼのサブユニットをコードしており、シトクロム *c* オキシダーゼの破壊株は強光下で光化学系 II が野生株よりも少ないことが既に報告されている。つまり、Chl 蛍光挙動を指標に選抜を行うと光化学系 I の減少量が少ない破壊株だけでなく、光化学系 II が野生株よりも大きく減少する破壊株も取得可能であることが示された。 F_{725}/F_{695} の増大は光化学系量比の変化の指標となるが、光化学系 I が多いのか光化学系 II が少ないのかは判別できない。そこで、シアノバクテリアにおいては細胞あたりのChl含量が光化学系 I 量の指標となることを利用し、細胞の吸収スペクトルからChl量を見積もった。その結果、強光下でChl量が野生株よりも多いもの (*slr1916*, *pmgA*, *ccmK2*, *slr1916* 破壊株; グループ I) とChl量が野生株と同じ程度のもの (*ctaEI*, *ctaCI*, *slr0645* 破壊株; グループ II) に分けられた (図2B)。これは、強光下でグループ I は光化学系 I が十分に減少せず、グループ II は光化学系 II が野生株よりも少ないことが意味する。また、破壊株の光混合栄養条件下での生育を観察すると、グループ I に含まれる破壊株のみが光混合栄養条件に感受性を示した (図3) ので、2つのグループの遺伝子の間には機能的差異が存在すると予想された。このことを念頭に、再度Chl 蛍光挙動を詳細に観察すると、*ctaEI*破壊株と*ctaCI*破壊株の蛍光挙動のみにおいて、励起光照射直後に、わずかな蛍光強度の減少が見られることがわかる。この減少は、末端酸化酵

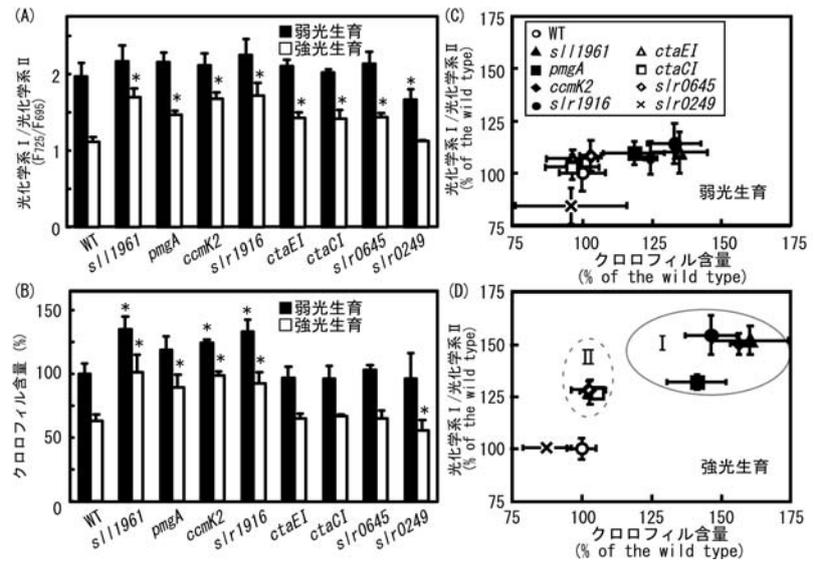


図2. 弱光および強光で生育させたシアノバクテリアの光化学系量比とChl含量
野生株では強光下で光化学系 I /光化学系 II が大きく減少するが *slr1916*, *pmgA*, *ccmK2*, *slr1916*, *ctaEI*, *ctaCI*, *slr0645* 破壊株では十分減少しない (A)。また、野生株では強光下でChl含量が大きく減少するが *slr1916*, *pmgA*, *ccmK2*, *slr1916* では十分減少しない (B)。強光下での表現型からグループ I とグループ II に分けられる (D)。

から、2つのグループの遺伝子の間には機能的差異が存在すると予想された。このことを念頭に、再度Chl 蛍光挙動を詳細に観察すると、*ctaEI*破壊株と*ctaCI*破壊株の蛍光挙動のみにおいて、励起光照射直後に、わずかな蛍光強度の減少が見られることがわかる。この減少は、末端酸化酵

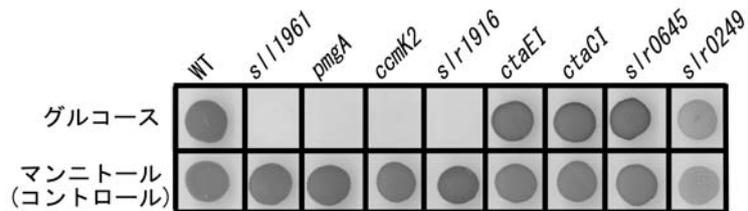


図3. 光混合栄養条件下での生育
上段は5 mM グルコース(光混合栄養条件)、下段は5 mM マンニトール(コントロール)を含む培地で $100 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ の光環境で生育させた。*slr1916*, *pmgA*, *ccmK2*, *slr1916*破壊株(グループ I)は光混合栄養条件で著しく生育が阻害された。

素の破壊によって暗順応の間に還元されたプラスキノンプールが励起光照射によって酸化される
として説明できる。この特徴を利用することにより、呼吸関連の制御因子の取得も可能になるの
ではないかと考えている。

上記の2つのグループに属さない *s1r0249* 破壊株は、弱光下でのみ F_{725}/F_{695} が野生型より小さ
く、また、強光下で Ch1 量が野生株よりわずかに少ないという表現型を示した (図2)。この破壊
株は生育が遅いこともあり、光化学系量比の調節と直接関わっていないのかもしれない。

3. 蛍光挙動の定量的解析

光化学系量比調節因子の探索は、蛍光挙動の特定の特徴に注目して行ったが、作成した500
株全ての破壊株について統合的な解析を行うためには、蛍光挙動が「似ている」ということの定
量化が欠かせない。しかしながら、最初に述べたように、異なる培地上の細胞の蛍光挙動を直接
比較することはできない。そこで、1つの培地上の各株5つのスポットの蛍光時系列データを時
間ごとに平均し、その結果をさらに時間ごとに同じ培地上の野生株のデータで割り算すること
によりノーマライズし、結果として得られた標準化時系列データ同士の偏差二乗和を計算すること
により蛍光挙動の非類似度とした。この際に、適切な重みを付けて計算した。強光順化した
s111961 株の蛍光挙動を基準とし、これとの非類似度により他の株を順位付けしたところ、先に
光化学系量比調節因子の候補として取得した破壊株が *pgmA* 破壊株も含めて上位に挙がった。この
ように計算した非類似度が定量パラメータとして十分に有効であることがわかる。

独立に培養した16の野生株についてその平均との非類似度をそれぞれ計算したところ、その
最大値を越す非類似度を野生株に対して持つ破壊株が高頻度で存在した。計算された非類似度
をもとに遺伝子の系統樹を作成すると、光化学系量比調節に異常のある破壊株は1つを除いて比較
的に近くに集まる。さらに、野生株との非類似度は、マイクロアレイにより強光照射15分後に有意
に発現が上昇すると報告されている遺伝子の破壊株の方が、それ以外の遺伝子の破壊株より大き
くなる。これらの結果は、蛍光挙動の非類似度という1つのパラメータによって遺伝子の機能に
関する様々な情報を得られることを示している。

[結論]

本研究ではシアノバクテリア遺伝子破壊株コレクションの蛍光挙動解析により、特定の機能に
異常のある破壊株を取得できることを示した。また、蛍光挙動を非類似度として定量化し、これ
を用いて遺伝子の機能クラスタリングを行うことができる可能性を示唆した。また、このパラメ
ータにより遺伝子の機能を発現量の変動などと関連づけて議論することも可能であると考えられ
る。少なくとも原核光合成生物を材料として用いた場合、破壊株の Ch1 蛍光挙動の経時変化を単
純に比較するだけで、様々な生命現象に関与する遺伝子を予測できる有用な手段となり得るこ
を示唆するものである。