

# 論文審査の結果の要旨

氏名 尾崎 洋史

本論文は2章からなり、第1章はクロロフィル蛍光の経時変化を利用した光化学系量比の調節に異常のある破壊株の単離、第2章はクロロフィル蛍光の定量的解析について述べられている。クロロフィル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、このクロロフィル蛍光測定を、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、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なえるシステムの構築を目指した。

第1章では、変異コスミドライブラリを用いて、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。OD<sub>730</sub>を0.5にそろえたシアノバクテリアの培養液を寒天培地に滴下し、強光で48時間または弱光で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クロロフィル蛍光の経時変化を45秒間測定した。クロロフィル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。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 *s111961* 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クロロフィル蛍光挙動を示す。そこで、類似の機能に欠損のある遺伝子破壊株は類似のクロロフィル蛍光挙動を示すと仮定した。この特徴を基準に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*, *s1r1916*, *ctaEI*, *ctaCI*, *s1r0645*, *s1r0249*) を候補株として選抜した。これらの候補株の光化学系量比を測定したところ、*s1r0249* 以外は、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、クロロフィル蛍光挙動を単純に比較する方法によって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。

第2章では、クロロフィル蛍光の定量化を試みた。1つ培地上の各株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た。結果として得られた標準化時系列データの *s111961* 破壊株との偏差二乗和を計算することにより蛍光挙動の単純非類似度とした。単純比類似度を小さい順に並べると、目で見えて選び出した破壊株の多くが上位に挙げたことから、単純非類似度はクロロフィル蛍光の挙動を反映していると考えられる。しかしながら、*pmgA* と *s1r0249* は125位と375位となり、上位に現れなかった。これら2つの破壊株も *s111961* 破壊株と似ていることから、単純非類似度には改良が必要である。そこで、*s111961* 破壊株と *pmgA* 破壊株で両者の違いが大きい点ほど軽く、似ている点ほど大きくなるよう自動的に重みを付け、この結果得られる値を破壊株特異的非類似度とした。この場合、先に述べた破壊株は29位以内に現れた。破壊株特異的非類似度は2つの破壊株から自動的に客観的且つ定量的なパラメータとして得られ、興味ある表現型を示す他の破壊株を効率良く得られるパラメータであると期待される。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。

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なうことができる可能性を示唆した。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、破壊株のクロロフィル蛍光挙動を比較するだけで、様々な生命現象に關与する遺伝子を予測できる有用な手段となり得ることを示唆するものである。

なお、本論文第1章は、池内昌彦、小川晃男、福澤秀哉、主査である園池公毅との共同研究であるが、論文提出者が主体となって実験および解析を行なったもので、論文提出者の寄与が充分であると判断する。

従って、博士（生命科学）の学位を授与できると認める。