

シアノバクテリア遺伝子のゲノムワイドな機能クラスタリング

●園池 公毅

東京大学大学院新領域創成科学研究科

〈研究の目的と進め方〉

現在までに数多くの生物において、全ゲノムの配列決定が完了し、その網羅的解析が進行中である。光合成のモデル生物として非常に重要な位置をしめるシアノバクテリアの一種 *Synechocystis* sp. PCC 6803 においても、かずさDNA研究所によってその全ゲノムの配列決定が完了し、ゲノムがコードする遺伝子の数はおよそ3,200と見積もられている。それぞれの遺伝子の破壊株の作成も、東大、名古屋大、京大などのグループを中心に進行し、近い将来には、トランスポゾンを利用して、すべての遺伝子の破壊株を網羅的に作成できると考えられる。また、遺伝子の発現に関してもDNAマイクロアレイの利用によって網羅的な解析が可能となっている。ところが、これらの遺伝子の働きの解析に重要な遺伝子破壊株の表現型の解析は、従来、1つ1つの破壊株について個別に行なわざるを得ず、その網羅的な解析は不可能であった。我々は近年、高等植物であるシロイヌナズナにおいて、その変異株をクロロフィル蛍光の2次元画像の時間変化を用いて解析してきたが、その過程において、シアノバクテリアにおいても、蛍光の時間変化を解析することにより、さまざまな遺伝子破壊株の表現型を解析することが可能であることを見出し、さらには、蛍光の強度変化を2次元画像として扱うことによって、一度に数多くの変異株を大量解析することを可能とした。

手法として用いるクロロフィル蛍光は、光合成の反応中心のうち系Ⅱと呼ばれるものから発光するが、光合成の系Ⅱ以外の電子伝達に関与する遺伝子はもちろん、呼吸関係の遺伝子、シグナル伝達関係の遺伝子など、数多くの遺伝子の影響を受けることが確かめられている。これは、原核生物であるシアノバクテリアにおいては、光合成系が葉緑体に隔離されている高等植物などとは異なり、呼吸の電子伝達鎖やその他の代謝経路、シグナル伝達経路に関わる遺伝子なども密接に相互関係を持つことに由来する。過去の我々の実験においてシアノバクテリアの光混合栄養条件での生育に必須な遺伝子の破壊なども、特定の実験条件を設定することにより表現型を解析できることが明らかとなっている。従来、このように広い範囲の遺伝子の解析を狙ってクロロフィル蛍光変化の解析が行われた例はほとんどない。さらに、2次元CCDカメラと組み合わせることによって、一度に多くの変異株の解析が可能となる。従来の研究とは異なり、ゲノム上の遺伝子の破壊株のすべてを網羅的に解析可能な点が本研究のもうひとつの大きな特色である。

シアノバクテリアは、原核生物でありながら高等植物型の酸素発生をする光合成を行うため、光合成のモデル生物として広く研究されてきている。特定の遺伝子の破壊株を作成し、その表現型を解析することによってその遺伝子の機能を調べることを目的とした研究は、国内外を問わず数多くなされており、その結果、個々の遺伝子の機能は徐々に明らかになりつつある。しかし、約3,200とされるシアノバクテリアのゲノムの遺伝子の数からすると、解析された遺伝子破壊株の数は1割にも満たない。

一方、遺伝子破壊株自体の作成は、精力的に進められており、すでに数多くの破壊株が作られているのみならず、トランスポゾンを用いた方法によって多くの遺伝子の破壊株の作成が可能であると考えられている。このような、破壊株の作成に、その解析が追いついていない状況を打開するために、本研究においては、2次元CCDカメラを用いた遺伝子破壊株の一括解析の方法を確立する。2次元CCDカメラを用いた蛍光解析自体はすでに光合成関係の遺伝子にターゲットを絞って行われているが、本研究においては、むしろ光合成以外の遺伝子に着目しているのが特色であり、このような網羅的解析を行った例は過去にない。本研究では、この新たな遺伝子の機能解析方法をシアノバクテリアにおいて確立し、これを用いて、シアノバクテリアのゲノムがコードする約3,200の遺伝子のすべての破壊株の表現型を網羅的に解析することによって、シアノバクテリアのゲノム機能を明らかにすることを目的とする。

〈研究開始時の研究計画〉

研究開始1年前の時点において、シロイヌナズナの低温感受性変異株の単離を試みているうちに、クロロフィル蛍光の2次元解析が、数多くの変異株の表現型の解析に極めて有効であることを見出した。さらに、この方法が、原核光合成生物であるシアノバクテリアの変異株の解析にも有効であるかどうかの検討をしたところ、光合成に直接関与する遺伝子の変異株のみならず、環境応答に関与する遺伝子なども、この方法で解析することが可能であることが示唆された。

そこで、以下のような計画によって実験を遂行することを考えた。

1. 非光合成遺伝子の解析可能性

光合成色素であるクロロフィルの蛍光は、当然、光合成関連遺伝子の機能の変化を検出するのに有効な方法であるが、本研究計画の骨子は、このクロロフィル蛍光の測定を用いて、光合成とは直接関連のない遺伝子の機能をも明らかにする点である。そこで、非光合成遺伝子のいくつかを選び、その変異株を作成し、変異株のクロロフィル蛍光を測定することにより、遺伝子の変異をクロロフィル蛍光により検出することができることを確認する。

2. 大量解析手法の確立

トランスポゾンによるランダムな変異の導入によりシアノバクテリアの変異株のプールを作成し、これに対してクロロフィル蛍光を測定することにより、遺伝子の変異により蛍光の表現型が変化した変異株のスクリーニングを行なう。

3. 解析条件の多様化

解析を最適培養条件で行なうのみならず、光強度、温度などを変化させ、その際の蛍光時間変化への影響を検討することによって環境変化を伝えるシグナル伝達に関わる遺伝子などについても情報が得られるような条件を用いれば、どのような遺伝子に関する情報が得られるの

かを詳細に検討して、広い範囲の遺伝子の破壊の効果を解析するシステムを確立する。

4. 網羅的な解析

前年度に確立された大量解析手法に基づき、ゲノム上の全遺伝子の変異株の網羅的な解析を推し進める。ランダムな変異による手法ではゲノムの全遺伝子の変異株の作成は難しいが、ゲノムの半分はカバーすることを考えている。

5. 個々の遺伝子の発現解析

クロロフィル蛍光測定による表現型が明らかとなった遺伝子変異株については、その原因遺伝子の野生株における発現を調べる。また、変異株内での遺伝子発現を特定遺伝子のみではなく網羅的に解析する。このために、変異株における遺伝子発現をDNAマイクロアレイを用いて野生株と比較する。このような解析によって、これらの遺伝子の機能を解明する糸口が得られるだけでなく、遺伝子相互の間の機能ネットワークをも明らかにできると期待される。

〈研究期間の成果〉

〈2000年度〉

2000年度は、上記計画1に対応し、シアノバクテリアの遺伝子破壊株36種について2次元蛍光画像解析システムによる測定を行なった。その結果、グルコース6リン酸脱水素酵素、NADH脱水素酵素、グルタレドキシシンなど、光合成に直接関与しない酵素の欠損株においても、クロロフィル蛍光強度の時間変化に明瞭な差が見られることが明らかになった。これは、蛍光を非光合成遺伝子の機能解明に用いた世界でも最初の例であると考えている。原理的には、蛍光の極大の位置、極大の大きさ、最終的な蛍光強度などの項目により、多くの変異株をクラス分けすることが可能であることを見いだした。

本年度の研究において、シアノバクテリアにおける遺伝子破壊株の大量解析手法をほぼ確立することができた。2次元CCDカメラを用いた蛍光解析自体はすでに光合成関係の遺伝子にターゲットを絞って行われているが、本研究においては、むしろ光合成以外の遺伝子に着目しているのが特色であり、このような網羅的解析を行った例は過去にない。これにより、トランスポゾンを用いて作成された全遺伝子の破壊株の網羅的解析に道を開くことができたと考えられる。

〈2001年度〉

2001年度は、上記計画2に対応し、トランスポゾンを利用した変異株の網羅的なスクリーニングを開始した。現在までに蛍光挙動に変化が見られる変異株9種を単離した。この変異株9種は5種類の蛍光パターンにクラス分けが可能であった。変異株のうち、1種については、トランスポゾンの挿入部位を決定した。

本研究により、蛍光の極大の位置、極大の大きさ、最終的な蛍光強度などの項目により、多くの変異株をクラス分けすることが可能であることを明らかにした。本研究の成果は、蛍光を非光合成遺伝子の機能解明に用いた、国内はもちろん、世界でも最初の例であると考えている。

当初、細胞を白金耳で塗り広げたプレートを用いて蛍光測定をおこなっていたが、細胞の塗り方による誤差を無視できないことが明らかになったため、まず、微量の液体培養をおこない、その培地の細胞濃度をそろえてプレートに滴下する方法を開発した。これにより、再現性が著しく向上し、当初の困難は回避された。

〈2003年度〉

当初、ランダムな遺伝子変異によるスクリーニングを進めたが、その場合、蛍光によって表現型を解析できる変異株の数は、対象とした遺伝子の約2%にしかならないことが明らかとなった。そこで、トランスポゾンにより遺伝子が破壊されたコンストラクトをクローン化し、破壊された遺伝子の配列を決定したものの26株について、改めて蛍光による表現型解析を行なった。その結果、13株で蛍光の表現型が野生株と異なり、本方法によって表現型の解析が可能な遺伝子は約5割に達する可能性が示された。

蛍光の表現型が野生型と異なった13株の変異株には、光化学系Ⅱの遺伝子、サイクリック電子伝達に関与している遺伝子、シグマ因子などさまざまな遺伝子があり、蛍光による遺伝子クラスタリングによって、遺伝子の機能解析を進めることができる可能性が示された。

〈2004年度〉

前年度の研究成果を受けて、測定条件の最適化を行なった。クロロフィル蛍光は、CCDカメラによって二次元の蛍光イメージングを行ない、シャッターを連続的に切ることにより時間の次元を含めた三次元のデータを取得した。画像処理により、複数のシアノバクテリアのパッチからの蛍光強度の時系列データに変換し、遺伝子変異株の情報を野生型のものと比較することにより、表現型の解析を行なった。その結果、

- 1) 光合成遺伝子に変異が入ると蛍光強度の時系列データは大きく変化すること
- 2) 非光合成電子に変異が入った場合にも、蛍光強度の時系列データの微妙な変化として検出できる場合が多いこと
- 3) ランダムに選択した非光合成系の遺伝子変異株67株について解析を行なった結果40株において蛍光挙動の差異を検出できること

の3点が示された。特に最後の結果は、光合成に直接関係のない遺伝子においてもその6割において、変異の影響をクロロフィル蛍光によって検出できることを意味する。これは、原核光合成生物において光合成という代謝系がいかに重要な位置を占めているか、という生理学的な観点から興味深いだけでなく、ゲノムの6割の遺伝子について、その変異株の表現型を単純な蛍光時系列データとして記述できることを意味している点で重要である。当初の研究目的としては、この時系列データを用い、遺伝子の機能的なクラスタリングを目指していたが、現時点においては、まだ解析対象の株数が40と少ないため有意なクラスターを形成するにいたっていない。これについては現在も研究を進行中である。

一方、これとは別に、上記のスクリーニングによって得られた変異株は、暗所から明所に細胞を移した際のクロロフィル蛍光の変化という表現型に注目したせいか、光環境応答に異常を示す変異株を複数単離することができた。これらの変異株には、光合成の2つの光化学系の量比を調節する新規な因子sll1961が含まれていた。この因子は、クロロフィル蛍光挙動が、過去に光化学系量比調節因子として報告されていたpmgAの変異株と似ていることによって単離することができた。この事実は、クロロフィル蛍光の類似性によって遺伝子をカテゴライズした時に、機能の類似したものが同じカテゴリーに入ること示しており、本研究の妥当性を図らずも示すこととなった。このように、本研究では、シアノバクテリア

の光環境応答に関しても多くの知見が得られ、それらは、論文の1-4として公表している。

〈国内外での成果の位置づけ〉

本研究のアイデアは、その発想の新規性が評価され、日米二国間セミナーにおいて以下の招待講演を行なった。

“Genome-wide categorization of photosynthetic and non-photosynthetic genes in *Synechocystis* PCC 6803 using chlorophyll fluorescence imaging system”: Japan-U.S. Cooperative Research Program “Microbial and Plant Metabolism - Function through Genomics”, Maui Prince Hotel, Maui, Hawaii, November 23-26, 2002

また、本研究から派生して発展したシアノバクテリアの光環境応答の研究成果も高く評価され、日本スイス二国間セミナー

“Mechanisms of acclimation to high-light condition in *Synechocystis* sp. PCC 6803”: Joint Japanese-Swiss Scientific Seminar “Biogenesis, Function and Acclimation of the Photosynthetic Apparatus” Kurashiki Kokusai Hotel, Okayama, September 29-October 3, 2003

国際光合成会議

“A PSI subunit, PsaK2, is involved in the regulation of state transition in *Synechocystis* PCC 6803”: 13th International Congress of Photosynthesis, Palais des congrès, Montréal, Canada, August 29-September 3, 2004

日本フィンランド二国間セミナー

“Regulation of Photosystem I under high-light condition”: Japanese-Finnish seminar on “Molecular Mechanisms of Regulation of Photosynthesis by Environments”, Holiday Club Caribia, Turku, Finland, November 2-7, 2004

スペインで開催されたユーロカンフェレンス

“High-light acclimation of *Synechocystis* sp. PCC 6803”: IVth Euroconference on the Molecular Bioenergetics of Cyanobacteria, San Feliu de Guixols, Spain, May 21-26, 2005

などに招待され、講演を行った。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

予想されなかった困難としては、測定系の感度の高さが上げられる。クロロフィル蛍光の初期変動は、細胞の状態を極めて敏感に反映するため、細胞の培養条件を均一に保たないと、再現性のある結果が得られない。それだけではなく、白金耳などで塗り広げた細胞は、場所によって濃淡が生じ、そのために均一な結果が得られない。これに関しては、まず、少量の液体培養を行ない、この培養液の細胞濃度を合わせてプレートに一定量滴下した上でさらに二日ほど培養し、それから測定を行なうことによって問題を解消した。しかしながら、様々な条件で、その条件を均一にすることは難しく、上記計画3の「解析条件の多様化」は未だに成功していない。

次に問題となったのは、解析対象の変異体である。当初は、かずきDNA研究所に登録されている、様々な研究者によって作成された数百にのぼる変異株を解析することを考えていた。しかしながら、上記で述べた検出感度の高さがあだとなって、親株（バックグラウンド）の異なる変異株同士では、比較が不可能であることが明らかとなった。これは、同じ「野生型」とされるシアノバクテリアの株であっても、研究室で培養する間に徐々に変異が生じ、それぞれ異なる蛍光挙動を示すようになっていくことが主な原因である。従って、以後は、トランス

ポゾンによって自分たちですべての変異株を作成することとした。

第3に問題となったのは、上記のトランスポゾンによる変異株作成の方法である。当初は、ゲノム決定に用いられたコスミドが挿入されたベクターにトランスポゾンランダムを導入することによって変異を入れ、これを用いて、シアノバクテリアを形質転換し、得られた変異体のプールを、まとめてクロロフィル蛍光測定にかけた。しかしながら、この方法をとった場合、対象とするORFのうち、クロロフィル蛍光挙動が野生型と異なるとして解析が可能であったものの割合は、わずか、2%程度であった。これでは、全ゲノムを対象としても、解析できる遺伝子の数は、数十に過ぎず、網羅的な解析とはとても言えない。そこで、方針を転換し、まず、トランスポゾンによって変異を入れたコスミドを一つ一つクローン化し、これの配列をすべて決定し、独立の遺伝子が破壊されていると確認できたクローンをを用いて、シアノバクテリアを形質転換することにした。この方法を用いた場合、変異株の半分以上がクロロフィル蛍光挙動の変化を示すことが示され、方法の有効性自体は証明された。しかしながら、コスミドのクローン化、配列決定、および、シアノバクテリアの形質転換に莫大な手間と時間がかかることとなり、2004年度までの間には、対象と考えていた遺伝子すべてのクロロフィル蛍光挙動を測定することはできなかった。

〈今後の課題〉

塩基配列情報は、バイオインフォーマティクスの手法にとっていわば「扱いやすい」情報であるが、遺伝子変異株の表現型情報は、その多様性と定性的な性質のため一般的に大量解析になじまなかった。しかし、光合成反応をいわば道具として使うことにより、遺伝子変異株の表現型情報を蛍光強度の一次元時系列データとして、いわば統一されたフォーマット上に蓄積することができる。このような形での表現型情報のデータベースをゲノムワイドに構築できれば、塩基配列情報、相互作用情報、局在情報その他の情報と組み合わせることにより、表現型と有機的に結びついた形での生命システムの構築が可能になると考える。

クロロフィル蛍光挙動の測定は、遺伝子破壊株の表現型を、単純な時系列数値データに還元する点に特色を持つ。表現型を単に数値データに置き換えるということであれば、例えば細胞の大きさを測定することなどによっても可能であるが、その場合、細胞の大きさから細胞内の情報を取り出すことは困難である。本計画で扱う情報は、光合成系の（主に酸化還元）情報を反映するため、蓄積された時系列データから、細胞内の様々な代謝系の酸化還元状態を推定することも原理的には可能である。従来、クロロフィル蛍光は光合成研究における解析手法として用いられてきたが、本研究をさらに発展させることにより遺伝子の変異株の表現型データベースとして活用できるようにしたい。

さらに、シアノバクテリアのゲノムの特徴として、細胞中に数十コピーのゲノムが存在するという点がある。従って、遺伝子破壊を行なった場合、全てのゲノム上の遺伝子が破壊されるには時間がかかる。しかし、本研究においては、ハイ・スループットな解析に重点を置き、全てのゲノムが破壊された遺伝子を持つものに置き換えることを確認する前に測定を開始した。このことは、マイナスだけではなく、プラスの側面をも持っている。細胞の生育にとって必須な遺伝子は、培養を継続しても全

でのゲノムが置き換わることはないが、このような方法の採用により、必須遺伝子の解析も可能になる。また、シアノバクテリアの細胞を形質転換後、測定を数日間の時間をおいて繰り返すことにより、ゲノムの置き換わりの影響を検証することができる。この場合、ゲノムの置き換わりがゆっくりと進行する遺伝子変異株については、複数回の測定において、表現型が徐々に変化していくことが期待される。この場合には、時間がたっても表現型が変化しなくなるまで測定を繰り返し、変化が見られなくなった最後の測定結果を最終的な表現型として扱うが、このように、ゲノムの置き換わりがゆっくりと進行する遺伝子については、各回の測定時に、破壊された遺伝子および正常な遺伝子を持つゲノムの割合をPCRで定量することにより、遺伝子の破壊の進行と表現型の変化の間の関係を定量的に解析することができる。このような遺伝子破壊の影響の定量的な解析が行なわれた例はほとんどない。このような解析を行える点も、表現型の測定自体は極めて短時間で行える本研究の特徴の一つであり、このような点についても研究を深めて行ければと思っている。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

1) 論文

1. 0110301107

Sonoike, K., Hihara, Y. and Ikeuchi, M. (2001) Physiological Significance of the Regulation of Photosystem Stoichiometry upon High Light Acclimation of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Cell Physiol.* 42, 379-384.

2. 0601311408

Hihara, Y., Sonoike, K., Kanehisa, M. and Ikeuchi, M. (2003) DNA microarray analysis of redox responsive genes in the genome of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J. Bacteriology* 185: 1719-1725.

3. 0601311413

Hihara, Y., Muramatsu, M., Nakamura, K. and Sonoike, K. (2004) A cyanobacterial gene encoding an ortholog of Pirin is induced under stress conditions. *FEBS Lett.* 574, 101-105.

4. 0601311418

Fujimori, T., Hihara, Y. and Sonoike, K. (2005) PsaK2 subunit in Photosystem I is involved in state transition under high-light condition in the cyanobacterium *Synechocystis* SP. PCC 6803. *J. Biol. Chem.* 280, 22191-22197.