（ 続紙 1 ）

京都大学	博士（　農　学　）	氏名	Hao LI
論文題目	Studies on the regulation of secondary metabolism in *Lithospermum erythrorhizon* using genome editing （ゲノム編集技術を用いたムラサキの二次代謝制御に関する研究）		

（論文内容の要旨）

シコニン誘導体（以下、シコニンと称す）は、一部のムラサキ科植物の根皮に含まれる脂溶性の赤色ナフトキノン化合物であり、止血、抗菌、抗炎症、抗ウイルス作用等様々な生理活性をもつことに加え、天然色素としての重要性から注目を集めている。これまでに、シコニン生産に影響する転写因子（LeERF1、LeEIL1、LeMBY1等）と、シコニン生合成に関与する酵素（PAL、HMGR、PGT、CYP76B74等）の一部が報告されている。シコニンの輸送に関しては、脂質小胞としてアクチンフィラメント依存的に細胞外に分泌されるモデルが示唆された。しかし、シコニン代謝の全容を解明するにはまだ未同定な遺伝子が多い。本研究では、代表的なシコニン生産種ムラサキ（*Lithospermum erythrorhizon*）をモデルとして、*in silico*解析によりシコニンの生産制御に関与する遺伝子の絞込みを行い、それら遺伝子の機能証明に向けてゲノム編集による遺伝子破壊、及び代謝産物の変動をLC-MS/MSで網羅的に調べる系を構築した。

1. 第１章では、シコニンを作る能力がムラサキ科植物の種、環境、及び組織によって異なることを利用し、ムラサキ科植物における遺伝子発現パターンとシコニン生産との関連性を評価する指標を設定した。まず、NCBIに登録されている次世代シーケンスデータを利用し、ムラサキ科植物 11種のトランスクリプトームの *de novo* assemblyを行い、遺伝子の発現量を算出した。次に、シコニンを生産するムラサキ毛状根において最小限数の遺伝子（56,674個）が発現していることを明らかにし、この遺伝子集団をリファレンスにして相同性検索を利用し、他植物のホモログ遺伝子をインデックス化した。異なるサンプル間の遺伝子発現量を分析し、4つのパラメータ：最小発現量（シコニンを生産したサンプルのみカウント）、暗黒発現指数、根発現指数、シコニン生産種発現指数を算出した。最小発現量が 5 Transcripts Per Millionより大きく、その他の発現指数が上位10%であったものを、シコニン関連遺伝子の候補と定義した。ここから、合計154個のシコニン関連遺伝子の候補が得られた。その半分以上は酵素と推定され、その中には従前同定されたシコニン関連遺伝子が全て含まれていた。この候補遺伝子リストの中から、3つの遺伝子、すなわち生合成酵素*LePGT-1*、暗黒化特異的発現タンパク*LeDI-2*、及び転写因子*LeBHLH-IVa1*を選択し、ゲノム編集でノックアウト（KO）することとした。ゲノム編集を行うにはムラサキのゲノム情報が必須である。そこで、NCBIで公開されたムラサキのショートリードデータの *de novo* assemblyを行った。得られたゲノム配列を基準に遺伝子の取得と、ゲノム編集のデザインを行った。

2. 第２章では、ムラサキのゲノム編集技術を確立した。*Rhizobium rhizogenes* ATCC15834株を使ってムラサキの無菌シュートから毛状根を誘導し、その際に CRISPR-Cas9 vector を利用して複数のgRNAを同時に発現させることで、ムラサキのゲノム編集毛状根を作製することに成功した。*LePGT-1*をKOした毛状根*LePGT-1*_KOでは4株、*LeDI-2*_KOでは5株、*LeBHLH-IVa1*_KOでは3株を得た。得られたKO毛状根からターゲット配列をPCRで増幅し、次世代シーケンサーMiseqで配列を解読した。その結果、*LePGT-1*_KOクローンではKO率がかなり低く、最高で39%しかなかった。一方、*LeDI-2*_KOラインにおけるKO率は43%～95%とばらついたが、#40株で最も高いKO率（95%）が得られた。*LeBHLH-IVa1*_KOでは、比較的長い deletionとinsertionが見られたため、Miseqでは解析できず、ロングリード次世代シーケンサ

ーであるMinIONで解析することにした。その結果、#95株では目的遺伝子が高効率で破壊され、KO率は100%に達した。以上の結果から、*LePGT-1*_KOについては次の解析ステップに進めることをやめ、最も遺伝子破壊が進んだ*LeDI-2*_KO #40株と*LeBHLH-IVa1*_KO #95株に関して、次のメタボローム解析を行うこととした。

3. 第３章では、毛状根の代謝物を網羅的に調べるため、高分解能LC-MSシステム Q Exactive Focusで毛状根の抽出物を分析することにした。抽出には、シコニン以外のムラサキ二次代謝産物も網羅的に解析するため、メタノールを利用した。LC-MSシステムの性能を最大限に発揮するため、溶媒系、イオン化条件、MS/MSの検出条件の最適化を詳細に行った。最適化された条件下において、全てのサンプルから合計2,323のピークが検出され、そのうち82%の化合物について、MS/MS データが取得された。これらのピークについて、先行文献、標品、mzCloudデータベースを利用してアノテーションを行った。毛状根は通常、シコニン生産を抑える 1/2 MS 培地で継代培養している。メタボローム解析の際には、control、*LeDI-2*_KO #40株、及び*LeBHLH-IVa1*_KO #95株の3種類の毛状根を無菌ポリスチレンプレートに移植し、1/2MS液体培地（シコニン非生産培地）とM9液体培地（シコニン生産培地）で15日間培養した。培養後の毛状根をメタノールで抽出し、抽出液中の代謝産物の測定を行った。シコニン非生産培地において、2つのKO毛状根はcontrolの毛状根と比べて大きな化合物変動を示さなかった。それに対し、シコニン生産培地において、2つのKO毛状根はcontrol毛状根に比べてほぼ全てのシコニン類、及び類縁のメロテルペンであるシコノフラン類において大きな減少を示した。ただし、例外としてtype II シコノフランの中で配糖体と思われる化合物は影響を受けなかった。詳細に解析したところ、*LeDI-2*_KO毛状根では63種の化合物が顕著に減少し、そのうち13種はMS/MSデータから化合物のアノテーションができた。特に、phosphatidylinositol (PI)、アラキドン酸、sulfoquinovosyldiacylglycerol (SQDG)、 phosphatidic acid (PA) などの極性脂質と脂肪酸が最も顕著に減少していること、次に、シコノフラン類、シコニン類、ポリフェノール化合物、リグナン、テルペン類の減少も見られた。*LeBHLH-IVa1*_KO毛状根においては、6種の化合物の増加と、135種の化合物の減少がみられた。MS/MSデータから同定可能な化合物49種は、全て減少を示した化合物だった。極性脂質と脂肪酸も軽微な減少傾向を示したが、特に減少が顕著だったのが、シコニン類、シコノフラン類、キノン類、及びそれらの部分構造を含む代謝物であった。

注）論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は１頁を３８字×３６行で作成し、合わせて、３，０００字を標準とすること。
論文内容の要旨を英語で記入する場合は、４００～１，１００wordsで作成し
審査結果の要旨は日本語５００～２，０００字程度で作成すること。

（論文審査の結果の要旨）

二次代謝産物は、人間にとって色素、香料、医薬品、工業原料、嗜好品などとして利用され、生活の質の維持向上にとって欠かせない天然資源である。こうした植物の二次代謝を深く理解することは、新奇な植物製品の開発や、持続可能な有用物質生産の観点からますます重要になってきている。薬用植物ムラサキのシコニン生産系は二次代謝研究の良いモデルであるが、未解明の点も少なくない。本研究では、次世代シーケンサーを用いた大規模データから網羅的にシコニン関連遺伝子候補を選定し、ムラサキで特定の遺伝子を破壊する技術と、生産された代謝産物を網羅的に比較解析する方法を確立し、シコニン生産制御に対する新たな遺伝子の役割を解明したものである。本論文の評価すべき点は以下の通りである。

1. ムラサキ科植物11種のトランスクリプトームデータをアセンブルし、植物種、環境、組織別に約6千万点の発現量データを計算した。最小のトランスクリプトームをインデックスし、6千万点データをそこにマッピングして、発現量データから発現傾向を計算することによって、次世代シーケンスデータをまとめるワークフローを実現した。これを利用し、発現傾向に基づいてシコニン生産に関連する候補遺伝子を154個選定した。次いでムラサキのゲノムを独自にアセンブルし、ゲノム編集に必要な配列情報基盤を整備した。
2. *Rhizobium rhizogenes* (ATCC15834) とCRISPR-Cas9 vector (pMgP237-2A-GFP) を用いて、ムラサキの無菌シュートから特定の遺伝子を破壊した毛状根クローンを作成する手法を確立した。次世代シーケンサーを用いて、毛状根ゲノムのモザイク変異を確認し、精密にKO率を計算することを可能とした。これにより、シコニン生合成と分泌系の解明を飛躍的に進める技術基盤を確立した。
3. ムラサキ毛状根において生産される二次代謝産物を抽出し、高分解能LC-MSシステムで分析する手法を確立した。これを用いて、ムラサキ毛状根の抽出物から合計2,323のピークを取得し、データベース化した。ゲノム編集により作成した暗黒下発現遺伝子*LeDI-2*のKO ラインと、転写因子*LeBHLH-IVa1*のKOラインの代謝物を網羅的に解析し、シコニンを含む代謝産物生産に対する両遺伝子の寄与を明らかにした。

以上のように本論文は、植物の二次代謝、特にムラサキ科植物に特有のシコニン系化合物の生産制御を解明するための基盤技術開発に貢献し、新奇遺伝子の機能を明らかにしたものであり、植物二次代謝化学、植物生理学、分子細胞生物学の発展に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、令和５年２月１３日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。また、本論文は、京都大学学位規程第１４条第２項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

注）論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日：　　年　　月　　日以降（学位授与日から３ヶ月以内）