

氏 名	阿久津 光紹
学 位 の 種 類	博士（食産業学）
学 位 記 番 号	第 5 3 号
学位授与年月日	令和 7 年 3 月 1 9 日
学位授与の条件	学位規程第 3 条第 3 項該当
学 位 論 文 題 目	Genomic analysis of the locust bean (<i>Ceratonia siliqua</i>) and bioprocess development for the production of thickening polysaccharides through cell culture
論 文 審 査 委 員	主査 日渡 祐二 副査 笠原 紳, 須田 義人

論文の要旨

イナゴマメ(*Ceratonia siliqua*)は、中東と地中海の亜熱帯地域に自生するマメ科の常緑高木である。その実は食用として 4000 年以上前から利用され、種子は接着剤や増粘剤の原料として利用されてきた。胚乳に含まれる多糖の一種であるガラクトマンナン(GM)は、ローカストビーンガム(LBG)と呼ばれ、食品用の増粘安定剤として工業的に重要な原料となっている。しかしながら、不作などにより LBG の供給は常に不安定であり、しばしば市場の混乱を招いている。一方で、イナゴマメは乾燥耐性がある等、その特有のメカニズムを解明することで植物科学に対して有益な情報が得られるが、公開されている遺伝子情報が不十分であり、分子生物学的アプローチが困難な状況にある。そのような背景から、本研究はバイオプロセスによる LBG の生産手段の開発を目標とし、その基盤となるゲノム解析と GM 生合成に関与する遺伝子の解析、細胞培養の検討を中心に、GM 生合成を評価するための LC-MS/MS を用いた微量分析法の開発を並行して行った。

イナゴマメの葉と胚乳からカルスを誘導し、葉、茎、胚乳、カルスそれぞれから多糖を熱水抽出し、酸分解してマンノースとガラクトースを LC-MS/MS で定量分析した結果、胚乳でのみマンノースが検出され、GM は胚乳特異的に生合成されることが示唆された。マンノースとガラクトースの MRM は 179.0/89.0 で同じであり、10 μ M まで定量可能であった。TIC では多くの夾雑物が検出され、LC-MS/MS 分析が有効であることが示された。細胞培養の検討において、カルスを液体の MS 培地で培養し、馴化した細胞を継代培養することで、液体培養が可能となった。葉から DNA を抽出し、NGS による HiFi シーケンスを行い、アセンブラーに Hifiasm を使用して *de novo* アセンブリにより概要ゲノムを構築した。コンティグ数 44、合計長 496 Mbp、N50 = 36 Mbp、BUSCO による完全性が 90% 以上であり、公開されているショートリードシーケンスのスクャホールドよりも非常に質の高い概要ゲノムが得られた。さらに、NGS による RNA シーケンスを行い、そのリード配列情報を加味して概要ゲノムに対して Augustus で遺伝子予測を行い、遺伝子注釈を付与した。得られた遺伝子情報をアミノ酸配列に変換し、マメ科植物といくつかのモデル植物のアミノ酸配列を用いて、Sonicparanoid でオーソロググループを形成し、網羅的にオーソログを推定した。イナゴマメの GM 生合成経路は明らかにされていないため、類似した GM を生成するクラスタ豆(*Cyamopsis tetragonoloba*)の生合成経路を参照し、GM 生合成に関与すると予想されるイナゴマメのオーソログをオーソロググループからピックアップした。それらの遺伝子に対し、葉、茎、胚乳、カルス由来の RNA シーケンスデータを用いて Bowtie2 と Stringtie でトランスクリプトーム解析を行った。また、GM を直接的に合成する mannan synthase (ManS) と galactomannan galactosyltransferase (GMGT) について、遺伝子が解明されているクラスタ豆のそれらの配列情報を用いて系統樹解析を行い、オーソロググループの中からイナゴマメの ManS 遺伝子と GMGT 遺伝子を推定した。TPM 値の比較から、胚乳で顕著に発現レベルが高い ManS と GMGT のオー

ソログがそれぞれ1つずつあり、それらは系統樹解析でクラスタ豆のオーソログと最も近いものと一致したことから、イナゴマメのGM合成に関与している可能性が高いと考えられた。これらをカルス内で強制発現させることでGMが合成されることが期待されるため、パーティクルボンバードメント法、アグロバクテリウム法により遺伝子導入を試みた。PCRによるマーカー遺伝子の検出、RT-qPCRによる相対定量により、遺伝子の導入と発現が確認された。しかしながら、形質転換したカルスからはマンノースが検出されず、GMは蓄積していないことが明らかとなった。GMの前駆物質となるGDP-MannoseとUDP-GalactoseのMRMを決定し、定量分析したところ、胚乳からはいずれも検出されたが、カルスからは検出されなかった。トランスクリプトームの結果から、GDP-Mannose生合成に関与するMannose Phosphate Isomerase (MPI)のオーソログ3つとUDP-Galactose生合成に関与するUDP-Galactose 4-Epimerase (GALE)のオーソログが、胚乳で発現レベルが高く、カルスで発現レベルが低いことがわかった。また、カルスの代謝を変えることでGMを生合成させられないか検討するため、胚形成を促進する転写因子BABY BOOM(BBM)のオーソログ3つについて解析したところ、いずれも胚乳で発現レベルが高く、カルスで発現レベルが低いことがわかった。これらの遺伝子の過剰により培養細胞でGM生合成が活性化する可能性がある。本研究では、イナゴマメ特有のガラクトース:マンノース比(1:4)を特徴とするGMの構成に関与する候補として、*ManS* 遺伝子および *GMGT* 遺伝子を同定した。これらの成果は、今後の機能解析を通じて目的とする糖組成の再現を可能にする基盤となるものであり、GMの細胞工学的生産に向けた重要な一歩である。

審査結果の要旨

本学位論文は、イナゴマメ (*Ceratonia siliqua*) を対象とし、ガラクトマンナン (GM) 生合成経路の解明とその安定的供給に向けた基盤技術の確立を目的としたものである。

イナゴマメ種子から得られるGMはローカストビーンガム (LBG) として増粘多糖類に広く利用されているが、その供給は不安定であり、安定供給のための技術基盤の確立が求められている。本研究では、ゲノム解析および細胞培養技術を活用し、GM生合成の分子基盤を明らかにするために、(1)ショットガン法によるイナゴマメの高精度ゲノムアセンブリの構築と遺伝子アノテーションの整備、(2)LC-MS/MSを用いたGMの定量法の確立とトランスクリプトーム解析によるGM生合成関連遺伝子の網羅的同定、(3)イナゴマメ培養細胞株の樹立および遺伝子組換え細胞を用いたGM生産の試みの3つの研究課題に取り組んだ。本学位論文はこれらの内容をまとめたものである。

(1)イナゴマメの葉から抽出したゲノムDNAを用いてHiFiシーケンス技術を活用したゲノム解析を行い、Hifiasmによる高精度ゲノムアセンブリを構築した。その結果、44のコンティグからなる全長496 Mbpのゲノムが得られ、N50値は36 Mbpであり、90%以上の完全性が確認された。RNAシーケンスデータを基にAugustusプログラムを用いた遺伝子予測とアノテーションを実施し、クラスタマメ (*Cyamopsis tetragonoloba*) のGM生合成経路を参照しながらSonicparanoidプログラムによりオーソログ群を同定し、GM生合成の最終段階に関与するmannose synthase (*ManS*) および galactomannan galactosyltransferase (*GMGT*) のオーソログ群を推定した。

(2)各組織(葉、茎、胚乳)から多糖を抽出し、LC-MS/MSによる定量分析を実施した結果、GMは胚乳に特異的に生合成されることが示唆された。LC-MS/MSによるmannoseとgalactoseの定量分析では10 μ Mまでの精度で測定可能であることが確認され、新たに開発した分析法の有用性が示された。さらに、トランスクリプトーム解析により、胚乳で高発現する*CsManS* 遺伝子および *CsGMGT* 遺伝子が特定され、これらの遺伝子の系統解析を行い、クラスタマメのGM生合成に関与するオーソログとの対応関係が明らかとなった。

(3)葉および胚乳から未分化細胞(カルス)を誘導し、液体MS培地での懸濁培養により細胞増殖効率を向上させた。アグロバクテリウム法およびパーティクルボンバードメント法を用いた形質転換法を確立し、*CsManS* 遺伝子および *CsGMGT* 遺伝子を導入した形質転換細胞を作出した。しかし、GMの蓄積は確認されず、さらにGM前駆物質であるGDP-mannoseおよびUDP-galactoseも検出されなかった。トランスクリプトーム解析の結果、GM前駆体合成に関与するmannose phosphate isomerase (MPI) および UDP-galactose 4-epimerase (GALE) が

胚乳では高発現している一方、カルスでは低発現であることが判明した。これに基づき、MPI および GALE を含む GM 生合成関連遺伝子群を同時に導入することで GM 生産細胞株を樹立する方策が提案された。

本研究は、イナゴマメの *de novo* 高精度ゲノムアセンブリによる遺伝子情報の提供、GM 生合成に関わる主要遺伝子 (*CsManS*, *CsGMGT*) の同定、培養細胞における形質転換技術の確立と GM 生産細胞株の確立に向けた提案という 3 つの主要な成果を挙げており、細胞農業技術を用いた LBG 生産の基盤を築くものとして高く評価できる。また、本研究成果の一部は、国際学術雑誌に阿久津氏を筆頭著者として掲載されている。

本学位論文は、研究背景、目的、方法、結果、考察が適切に記述されており、博士論文として十分な内容を有している。また、論文の構成も、序章、各章、総合考察として整理され、全体の流れも明確である。また、本学位論文は英文で書かれており、英語の能力に関しても博士の学位に足る十分な能力を有するものと判定した。

以上の点を総合的に判断し、本学位論文は博士(食産業学)の学位を授与するに値すると判断する。