

論文内容の要旨

申請者氏名 Ramachandran, Vasagi

Vascular system is one of critical tissues for vascular plants to transport water and photosynthetic product. In the case of xylem cells, which function in water conduction and supporting, thick lignified cell walls, called secondary cell walls (SCWs) are generated. SCWs provide stiffness and strength as well as waterproofness to plant cells, and thus the regulation of SCW biosynthesis is a vital issue for vascular plants. Previous screening of Arabidopsis transgenic lines overexpressing xylem vessel element differentiation-related genes identified two Dof genes, named *VASCULAR-RELATED DOF1 (VDOF1)* and *VDOF2*, as novel factors to increase glucose yields from stem samples by enzymatic saccharification treatment, suggesting that VDOF1 and VDOF2 regulate SCW properties associated with saccharification efficiency. In this thesis work, the applicant focused on molecular functional analysis of these VDOF transcription factors, to reveal their roles in regulating vascular cell differentiation.

Transient expression analysis suggested that VDOF2 has transcription repressor domain. Expression pattern analysis of VDOF1/2 using YFP and GUS reporters indicated that they are expressed in vascular tissues. Generated *VDOF1* and *VDOF2* overexpressors (*VDOF1ox* and *VDOF2ox*) showed growth variations in the 14-day-old seedlings, however the growth defects recovered during subsequent growth period, resulted in comparative plant sizes compare to the wild-type at 40-day-old. Notably, the vein patterning in 7-day-old and 14-day-old cotyledons was affected in *VDOF1ox*, *VDOF2ox* and *vdof1 vdo2*, and the data suggested the vein formation was enhanced in *vdof1 vdo2*. Histochemical staining indicated that lignin deposition was enhanced in the young regions of 40-day-old *vdof1 vdo2* inflorescence stems, while *VDOF1ox* showed the reduction of lignin signals in the middle regions of stems. Total lignin contents demonstrated that total lignin amounts in the bottom regions of stems were significantly increased in *VDOF1ox* and *vdof1 vdo2* compared to the wild type, whereas the *VDOF2ox* stems showed a slight reduction. The RNA-seq analysis using inducible VDOF overexpression lines suggested that genes for cell wall biosynthesis, including lignin biosynthetic genes were significantly enriched in the list of common target genes. In inflorescence stems of *VDOF1ox*, *VDOF2ox*, and *vdof1 vdo2*, the expression patterns of these lignin-related genes were changed, correlating to the observations of lignin deposition phenotype.

Taken together, the applicant concluded that VDOF1 and VDOF2 are novel regulators of vascular cell differentiation. Future utilization of these VDOF genes can become a new biotechnological strategy to design SCW property by lignin modification.

論文審査結果の要旨

申請者氏名 Ramachandran, Vasagi

維管束は維管束植物にとって生存に必須な重要な通道組織である。維管束細胞のうち、木部細胞はリグニン化した二次細胞壁を沈着させるが、二次細胞壁は陸上バイオマスの供給源になっている。すなわち、維管束細胞の分化過程の分子的理解は、基礎科学的にも応用産業的にも重要な課題であると言える。先行研究によって行われた木質バイオマスの酵素糖化効率を指標とした新規細胞壁改変因子のスクリーニングの結果、2つの DOF 転写因子 *VASCULAR-RELATED DOF1 (VDOF1)* および *VDOF2* が、糖化効率を上昇させる因子として単離されていた。本研究では、*VDOF1* および *VDOF2* の維管束細胞分化における分子機能の解明を行った。

一過的発現解析の結果、*VDOF2* は弱い転写リプレッサー活性を示すことが分かった。また、*VDOF1* および *VDOF2* は植物発生を通じて維管束領域で発現していた。*VDOF1* および *VDOF2* の過剰発現体、および *vdof1 vdo2* 二重変異体を作成し、表現型解析を行ったところ、どちらにおいても子葉における葉脈ネットワークの乱れが観察された。とくに *vdof1 vdo2* では葉脈形成の抑制が見られたことから、*VDOF1* および *VDOF2* は葉脈形成の負の制御因子であると考えられた。また、40日齢の植物体の花茎を観察したところ、*vdof1 vdo2* では若い花茎でリグニン蓄積が亢進していることが分かった。対して、*VDOF1* 過剰発現体では花茎中央部でのリグニン蓄積が減少していた。成熟した花茎サンプルを用いたリグニン定量の結果、*VDOF1* 過剰発現体および *vdof1 vdo2* ではリグニン量の上昇、*VDOF2* 過剰発現体ではリグニン量の減少が見出された。さらに *VDOF1* および *VDOF2* の誘導発現体を用いた RNA-seq の結果、*VDOF1* および *VDOF2* の下流候補因子には、リグニン生合成遺伝子を含む細胞壁関連因子が有意に濃縮されていることが示された。また、*VDOF* 過剰発現体および *vdof1 vdo2* の花茎で、これらリグニン生合成遺伝子の発現パターンが大きく乱されていることを突き止めた。

こうした結果から、*VDOF1* および *VDOF2* は、維管束細胞分化制御に関わる新規転写制御因子であることが明らかとなった。また、リグニン生合成制御への関与は、*VDOF1* および *VDOF2* の機能改変が木質バイオマスの利活用性向上につながる新規のバイオテクノロジーを生み出す可能性を示唆しており、意義深い成果であったと考えられる。

以上のように、本論文は新規の維管束細胞分化制御因子の分子機能を明らかにするとともに、さらに新規バイオテクノロジー技術の萌芽となりうる成果を挙げたものであり、学術上および応用上、一定以上の貢献が期待される。よって審査委員一同は、本論文が博士（バイオサイエンス）の学位論文として価値あるものと認めた。