

# 論文内容の要旨

申請者氏名 Uy, Abigail Loren Tung

Xylem vessel cell differentiation is marked by the deposition of secondary cell wall (SCW), made up of cellulose, hemicellulose and lignin. The biosynthesis of SCW is regulated by VASCULAR-RELATED NAC DOMAIN (VND) proteins, a set of NAC transcription factors, the overexpression of which induces ectopic xylem vessel cell differentiation effectively and synchronously. A previous study on the inducible overexpression of VND7 using the GR-DEX inducible system in tobacco BY-2 cells indicated significant changes in primary metabolites during xylem vessel cell differentiation; however, the metabolic flows and regulatory metabolic steps in xylem vessel cell differentiation are not yet well elucidated. In this study, metabolomic analysis was performed using VND7-inducible *A. thaliana* T87 suspension cells to obtain novel insights into primary metabolic regulation important for SCW biosynthesis. This included analysis of metabolic amounts,  $^{13}\text{C}$  labeling experiments, and comparisons with transcriptome activity.

Firstly, it was confirmed that xylem vessel cell differentiation is mostly occurring between 24 to 48 hours after induction (HAI). From these differentiating cells, 57 metabolites were quantified by Capillary Electrophoresis Time of Flight Mass Spectrometry (CE-TOF MS). Sparse Partial Least Squares Discriminant Analysis (sPLSDA) of the data indicated significantly changed metabolic profiles during the differentiation. Further data analysis with heatmap and metabolic pathway map indicated that similar metabolic trends occurs for similarly categorized metabolites and that essential precursor metabolites for SCW polymers, such as glucose-6-phosphate, UDP-glucose, erythrose-4-phosphate, and phenylalanine, were transiently increased at 12 to 24 h of DEX treatment.

Next,  $^{13}\text{C}$  labeling experiments was carried out to provide insight on metabolic flow during xylem vessel cell differentiation. As a result, time-course CE-TOF MS analysis quantified the  $^{13}\text{C}$  labeling ratio for 44 metabolites, of which 18 metabolites showed the increased and decreased  $^{13}\text{C}$  labeling ratios after the induction. The increased carbon flow was observed with lignin biosynthesis precursors, including ribose-5-phosphate, shikimate, phenylalanine, and 3-phosphoglycerate. On the other hand, the decreased carbon flow towards pyruvate derivatives, including lactate, was found. These data indicate the metabolic flow for lignin biosynthesis is constantly activated during xylem vessel cell differentiation.

Finally, the comparative analysis of transcriptome and metabolome data was carried. Transcriptome data indicates active regulation of primary metabolic pathways during the differentiation; enzyme genes for UDP glucose biosynthesis and in shikimate pathway for production of phenylalanine were upregulated significantly. In contrast, glycolysis pathway genes (for lactate production), were significantly downregulated. As the expression pattern is partially correlated with observed metabolomic dynamics, active regulation of primary metabolism during the differentiation is expected to be under transcriptional control.

Taken together, the study successfully showed active regulation of primary metabolism for SCW polymer biosynthesis. This active regulation would be, at least partly, through transcriptional regulation of enzymatic genes.

やむを得ない事由[ 図書出版, 学術雑誌等への掲載, 特許・実用新案出願, 個人情報等の保護, その他 ( ) ]により本要旨を非公表とする。

【※該当する事由に○印をすること】

# 論文審査結果の要旨

申請者氏名 Uy, Abigail Loren Tung

木部道管細胞は維管束植物の生存に必須な水の通道を担う細胞であり、その分化過程で、セルロース、ヘミセルロース、リグニンからなる二次細胞壁を形成する。本研究で申請者は、木部道管細胞の二次細胞壁形成のメカニズムのさらなる理解に向けて、木部道管細胞分化過程における代謝物量の変動と代謝フローを詳細に解析した。これには時系列での解析が重要であり、道管細胞分化マスター転写因子 VND7 を利用して、人工コルチコイドであるデキサメタゾン (DEX) の添加によって高効率かつ同調的に道管細胞分化を誘導できるシロイヌナズナ T87 培養細胞を用いた。さらに、トランスクリプトームデータとの比較解析を行った。主な発見は以下の通りである。

1. 道管細胞分化過程での Electrophoresis Time of Flight Mass Spectrometry (CE-TOF MS) 解析を行うことで、57 の代謝物を定量化することに成功した。さらに、Sparse Partial Least Squares Discriminant Analysis (sPLSDA)によって、これら代謝物プロファイルが分化過程で劇的に変動していることを示した。また申請者は、heatmap および metabolic pathway map 解析によって、類似した一群の代謝物が似かよった変動パターンを示し、glucose-6-phosphate、UDP-glucose、erythrose-4-phosphate、phenylalanine といった二次細胞壁ポリマーの前駆代謝物が分化誘導初期に増加することを明らかにした。

2. 申請者は、<sup>13</sup>C ラベル実験を行うことで道管細胞分化過程での代謝フローを解析した。時系列サンプルの CE-TOF MS 解析によって、44 の <sup>13</sup>C ラベル代謝物を見だし、そのうち、18 の代謝物の量が分化過程で増減することを示した。増加する代謝物は、ribose-5-phosphate、shikimate、phenylalanine、3-phosphoglycerate といったリグニンの前駆体だった。一方、減少する代謝物は lactate を含むピルビン酸派生代謝物であった。これらの結果から、道管細胞分化過程でリグニン生合成に向かう代謝フローが活性化されることを示すことに成功した。

3. トランスクリプトームデータとメタボロームデータの比較解析を行った。詳細なトランスクリプトームデータ解析から、一次代謝経路に関わる多様な酵素遺伝子群の発現が活発に増減することが示された。とくに、UDP glucose 合成に関わる酵素遺伝子群と phenylalanine 合成につながる shikimate pathway に関わる酵素遺伝子の発現が上昇する一方で、乳酸合成に向けた解糖系の酵素遺伝子の発現は顕著に低下することを見いだした。また、これらの遺伝子発現変動が代謝物の蓄積量やフローの変動と深く関連していることを示し、道管細胞分化過程における一次代謝物の活発な変動が転写調節によって制御されている可能性を示すことに成功した。

以上のように、本論文は道管細胞分化過程における二次細胞壁形成のしくみについて、代謝物の観点から新たな知見をもたらしたもので、学術上、高い貢献が期待される。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。

やむを得ない事由 [ 図書出版, 学術雑誌等への掲載, 特許・実用新案出願, 個人情報等の保護, その他 ( ) ]により本要旨を非公表とする。

【※該当する事由に○印をすること】