

論文内容の要旨

申請者氏名 PHOOKAEW PAWITTRA

Xylem vessels execute the function of long-distance conduction of water in land plants to survive on the dry condition, which are characterized by secondary wall deposition (SCW) and programmed cell death (PCD). The vessel differentiation is known to be regulated by NAC transcription factors, VASCULAR-RELATED NAC-DOMAIN (VND) protein family. For further understanding of the molecular mechanisms of xylem vessel cell differentiation, *seiv1* to *seiv9* (for *suppressor of ectopic xylem vessel cell differentiation induced by VND7*) mutants were previously isolated as suppressor mutants of Arabidopsis VND7-inducible line (*VND7-VP16-GR*).

In this study, *seiv2* to *seiv9* were analyzed in detail. In wild-type *VND7-VP16-GR*, VND7 is functionally activated by the DEX treatment to promote ectopic xylem vessel cell differentiation, while the ectopic xylem vessel cell differentiation was inhibited in *seiv* mutants particularly in above-ground tissues. The induction level of VND7-downstream genes was remarkably decreased in the shoot regions of *seiv* mutants, suggesting that the *seiv* mutations would affect the transcriptional regulation of xylem vessel cell differentiation widely. Next, the responsible genes for *seiv* mutants were identified by whole-genome resequencing analysis combined with genomic fragment introduction. Finally, it was found that *seiv5*, *seiv6*, and *seiv9* mutants possessed a single nucleotide substitution in the gene encoding PLANT U-BOX 36 (PUB36), an uncharacterized F-box protein (FBX), and UBIQUITIN-SPECIFIC PROTEASE 1 (UBP1), suggesting that the misregulation of protein ubiquitination should lead to the *seiv* phenotypes.

Next, further transcriptome and proteome analysis for *seiv6* and *seiv9* was conducted. RNA-seq data suggested that the mutations of *FBX* and *UBP1* genes can disturb the transcriptional activation of xylem vessel cell differentiation-related genes induced by VND7. Genome-wide protein ubiquitination analysis of *seiv6* and *seiv9* seedlings showed that ubiquitination of a specific set of proteins, such as CESA4, CESA8, IRX12, and FLA11, was enhanced upon DEX treatment. Also, 885 ubiquitination sites were specifically observed during xylem vessel cell differentiation, suggesting that protein ubiquitination would be actively regulated for xylem vessel cell differentiation. Moreover, the Lys94 in the conserved NAC domain of VND7 was ubiquitinated in the DEX treatment-dependent manner in the wild-type *VND7-VP16-GR*, which was confirmed by a transient reporter expression assay: the substitutions of Lys94 to Arg in VND7 significantly decreased the transactivation activity of VND7.

Taken together, this study successfully provided a novel perspective of protein ubiquitination, as one of active regulatory layer for xylem vessel cell differentiation. It is also suggested that the ubiquitin-related factors identified from *seiv* mutant analysis would modulate the cell competency to differentiate into xylem vessel cells via the regulation of VND7 activity.

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 PHOOKAEW PAWITTRA

陸上植物における長距離の水輸送を担う木部道管は、二次壁沈着とプログラム細胞死によって特徴付けられる。この道管細胞の分化は、NAC 転写因子である VASCULAR-RELATED NAC-DOMAIN (VND) タンパク質ファミリーによって制御されていることが様々な研究から示されており、シロイヌナズナ VND7 誘導株 (VND7-VP16-GR) のサプレッサー変異体として、*suppressor of ectopic xylem vessel cell differentiation induced by VND7(seiv) 1~seiv9* 変異体の単離も行われてきたが、その詳細は明らかではなかった。申請者は、VND ファミリーによる道管分化制御について *seiv2* から *seiv9* について詳細解析を行い、以下に示す知見を得た。

まず、野生型 VND7-VP16-GR では、DEX 処理により VND7 が活性化され、異所的な道管分化誘導されるが、*seiv* 変異体では特に地上部における道管細胞分化が抑制されることを示した。このとき、VND7 下流遺伝子の誘導レベルは、地上部で顕著に低下しており、*seiv* 変異体は道管分化の転写制御に広く影響を与えていることを示唆した。次に、*seiv* 変異体の原因遺伝子の同定を進め、*seiv5*, *seiv6*, *seiv9* 変異体はそれぞれ、PLANT U-BOX 36 (PUB36)、F-BOX タンパク質 (FBX)、UBIQUITIN-SPECIFIC PROTEASE 1 (UBP1) をコードする遺伝子に 1 塩基置換が生じていることを示し、タンパク質ユビキチン化の制御異常が *seiv* 表現型の原因となっている可能性を示唆した。

次に、比較的強い抑制表現型を示した *seiv6* と *seiv9* について、トランスクリプトームとプロテオーム解析を行った。その結果、FBX 遺伝子と UB1 遺伝子の変異は、VND7 による下流遺伝子群の転写活性化を阻害することが示唆された。さらに、*seiv6* と *seiv9* のゲノムワイドなタンパク質ユビキチン化解析を行ったところ、CESA4、CESA8、IRX12、FLA11 などの特定のタンパク質のユビキチン化が DEX 処理によって増強されることが示された。また、885 個のユビキチン化程度が道管分化の過程で特異的に上昇したことから、タンパク質のユビキチン化が道管分化過程で積極的に制御されていることが示唆された。さらに、VND7 の Lys94 がユビキチン化されており、VND7 の Lys94 を Arg に置換することで、VND7 の転写活性化能が有意に低下することを示した。

以上のように、本論文は、タンパク質のユビキチン化が木部道管細胞の分化制御に関わることを新たに示すことに成功したもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。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】