

論文内容の要旨

申請者氏名 Xu Bo (徐 波)

The development of specialized cells for water conduction and mechanical support is one of most critical evolutionary processes that facilitated the colonization of terrestrial environments by plants. Recent studies revealed that a group of NAC domain transcription factors, including VND1 to VND7, NST1, and NST3/SND1 in *Arabidopsis thaliana*, function as key regulators for differentiation of xylem vessels (water conduction) and xylem fibers (mechanical support) in vascular plants, respectively. However, it is still unclear how vascular plants developed those cells from their non-vascular ancestors.

In this research, the functions of eight genes (*PpVNS1* to *PpVNS8*) of *Physcomitrella patens*, which are homologous to *AtVND* genes, were thoroughly analyzed. The expression analysis of *PpVNS* genes revealed that all genes (except *PpVNS3*) are expressed in gametophores (i.e. in the midrib of developing young leaves, rhizoids, and stem), protonemata, and/or sporophore.

A triple KO mutant of *PpVNS1*, *PpVNS6* and *PpVNS7*, which are predominantly expressed in the developing midrib, exhibited absence of water-conducting cells (hydroids) in leaves and abnormal supporting cells (stereids) with reduced wall thickness and retained cellular contents, leading to deficient water transport in their leaves, with wilted leaves under lower relative humidity. The gametophore stems of *PpVNS4* KO mutant harbored immature hydroids and failed to transport water, resulting in wilted leaves under lower relative humidity. These results indicate critical roles of *PpVNS* genes in the development of hydroids and stereids in mosses.

To further investigate the function of *PpVNS* genes, an overexpression assay was conducted. In *A. thaliana*, overexpression of *PpVNS* genes induced ectopic secondary cell wall (SCW) formation through the upregulation of *AtVND7* and/or *AtNST3/SND1*-downstream genes, such as *AtMYB46*, *AtXCP1* (for programmed cell death) and *AtCesA4* (for SCW formation). In *P. patens*, overexpression of *PpVNS* genes induced rapid degradation of chloroplasts, shrinkage of protoplasm and loss of plasma membrane integrity, leading to programmed cell death. Accordingly, the expression of *P. patens* genes homologous *AtCesA* and *AtXCP* was checked in the *PpVNS7* overexpressor line, which showed that one *P. patens CesA* gene and several *XCP* genes were statistically upregulated. These findings suggest that *PpVNS* genes are able to induce cell wall thickening and programmed cell death by promoting the expression of corresponding genes in both *P. patens* and *A. thaliana*.

This research demonstrates that the *PpVNS* proteins are key switches for the development of hydroids and stereids, acting to regulate programmed cell death or autolysis of cellular contents and cell wall thickening in non-vascular mosses, suggesting that the VNS family regulates the differentiation of water conducting cells and supporting cells through a similar VNS-based gene regulatory network in land plants. Considering that hydroids and stereids occurred mainly in the gametophytic generation whilst xylem vessels and fibers exist only in sporophytic generation, it could be supposed that the VNS-based gene regulatory network was recruited from the gametophytic generation and elaborated in the sporophytic generation to form xylem vessels and fibers during plant evolution, suggesting the contribution of VNS family to colonization of land by plants.

論文審査結果の要旨

申請者氏名 Xu Bo (徐 波)

植物が進化の過程で通水細胞と支持細胞を発達させたことが、植物の陸上化において極めて重要なイベントであったと考えられる。近年の研究により、シロイヌナズナを含む種子植物において、NAC 型転写因子をコードする VND/NST/SND 遺伝子ファミリーがこれらの細胞の分化を制御する鍵因子であることがわかってきたが、維管束植物がコケなどの非維管束植物からの進化の過程でどのように通水細胞と支持細胞を分化させる仕組みを手に入れたのかについては不明の点が多かった。申請者は、モデルコケ植物であるヒメツリガネゴケを用いて、ヒメツリガネゴケの通水細胞と支持細胞の分化の仕組みについて解析を行い、下記の新規の知見を得ることができた。

- 1) ヒメツリガネゴケには 8 つの VND/NST/SND 遺伝子オルソログ (*PpVNS1*~8) が存在し、*PpVNS3*を除く 7 つが茎葉体の葉の中肋や茎の中心部などに発現する。
- 2) *PpVNS1, 6, 7*は茎葉体の葉の中肋で強く発現することから、葉の中肋に存在する通水細胞と支持細胞の分化への関与が示唆された。そこで、*PpVNS1, 6, 7*の 3 重 KO 変異体を作成したところ、葉における水輸送の障害とそれに起因する低湿度条件下での葉の萎れが観察された。さらに、3 重変異体の詳細な細胞形態観察により、通水細胞 (hydroid) の分化障害と支持細胞 (stereid) の細胞壁形成抑制が確認された。
- 3) *PpVNS4*が茎葉体の茎の中心部に発現することから、*PpVNS4* の KO 変異体を作成したところ、水輸送の障害、低湿度条件下での葉の萎れ、通水細胞の分化障害が観察された。
- 4) さらに *PpVNS* 遺伝子の機能を解析するために *PpVNS* 遺伝子をシロイヌナズナで過剰発現させた。その結果、すべての *PpVNS* 遺伝子が、シロイヌナズナの VND/NST/SND 遺伝子の制御下にある二次細胞壁形成や細胞死に関連する遺伝子発現を誘導するとともに異所的な二次細胞壁形成を誘導した。また、ヒメツリガネゴケでの過剰発現では、糸状体や茎葉体において急激な葉緑体の分解や原形質膜の崩壊といったプログラム細胞死が誘導された。この時、シロイヌナズナの二次細胞壁形成や細胞死に関連する遺伝子の推定オルソログの発現が誘導された。

これらの結果から、ヒメツリガネゴケ *PpVNS* 遺伝子がシロイヌナズナ VND/NST/SND 遺伝子と同じ遺伝子発現ネットワークを利用して、維管束植物とは異なるタイプの通水細胞 hydroid と支持細胞 stereid の細胞分化を制御する鍵因子であることを示すことに成功した。

以上のように、本論文は植物における通水細胞と支持細胞の分化が進化的基盤の一端を見出したものであり、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。