

氏 名 Zhang, Liechi

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大乙第287号

学位授与の日付 2024年3月22日

学位授与の要件 学位規則第6条第2項該当

学位論文題目 Functional analysis of ABCB14 in *Physcomitrium patens* reveals a regulatory mechanism for anisotropic cell expansion through cuticle deposition

論文審査委員 主査 上田 貴志  
基礎生物学コース 教授  
長谷部 光泰  
基礎生物学コース 教授  
森田(寺尾) 美代  
基礎生物学コース 教授  
藤田 知道  
北海道大学 大学院理学研究院 教授

# Summary of Doctoral Thesis

Name in Full : Zhang, Liechi

**Title : Functional analysis of ABCB14 in *Physcomitrium patens* reveals a regulatory mechanism for anisotropic cell expansion through cuticle deposition (ヒメツリガネゴケの ABCB14 の機能解析から明らかになったクチクラ沈着を介した細胞の異方成長を制御する分子機構)**

The relative position of plant cells is fixed by their communal cell wall, making the precise control of cell expansion direction and rate crucial for organ morphogenesis. Cell expansion anisotropy is governed by the mechanical anisotropy of the cell wall, which primarily consists of polysaccharides—namely, cellulose, hemicellulose, and pectin. Modifying these polysaccharides or their interactions can modulate the mechanical property of the cell wall, thereby serving as the targeting points of mechanisms regulating cell expansion. In addition to the cell wall polysaccharides, the common ancestor of land plants has developed a hydrophobic cuticle enveloping the outer cell walls of aerial tissues. This cuticle layer is also subjected to tensile stress and mechanically restricts cell and organ expansion. The restriction can be alleviated by supplying new cuticular materials to the expanding surface. However, the molecular machinery that deposits cuticle materials in the appropriate spatiotemporal manner to accommodate cell and organ expansion remains elusive.

In this study, I have addressed this question through the functional analysis of ATP-binding cassette (ABC) transporter B14 in the moss *Physcomitrium patens* (*P. patens*). ABC transporters translocate substrates across the cell membrane in eukaryotes. Most B-type ABC transporters (ABCB) in plants characterized to date appear to function as auxin transporters, while some of them exhibit affinity for multiple substrates, such as ABCB14 in *Arabidopsis thaliana* (AtABCB14). AtABCB14 was reported to import malate to modulate stomatal conductance and has been shown to

export auxin when expressed in cultured cells. Present knowledge of ABCB14 clade transporters is limited to flowering plants, hampering the understanding of its role in plant development and evolution.

*P. patens* and flowering plants diverged from a common ancestor more than 400 million years ago. Phylogenetic analysis revealed two orthologs of *AtABCB14* in *P. patens*: *Pp3c1\_34680* and *Pp3c3\_5680*. While I could not obtain gene deletion mutants of *Pp3c3\_5680*, I successfully deleted *Pp3c1\_34680* via homologous recombination and designated it as *PpABCB14*. Phenotyping revealed that *Pp3c1\_34680* mutant plants formed gametophores with shrunken leaves, suggesting its function in leaf morphogenesis.

Leaf development in *P. patens* starts with an asymmetric division of the tetrahedral apical stem cell of the gametophore, which self-renews and repeatedly yields daughter cells. The daughter cell subsequently divides, giving rise to two cells: one that contributes to the formation of the stem and the other that becomes a leaf apical stem cell to initiate leaf development. To trace the localization of PpABCB14 during leaf development, I inserted a gene encoding fluorescent protein mClover3 before the start codon of native *PpABCB14* gene to generate mClover3-PpABCB14 transgenic lines and observed its localization during leaf development. No mClover3-PpABCB14 signal was detected in the gametophore apical stem cell, but fluorescence was evident on the distal surface of the leaf apical stem cell, which expanded anisotropically. The fluorescence from mClover3-PpABCB14 on the plasma membrane shifted dynamically, marking the regions of active cell expansion, and its amounts positively correlated with the expansion rate of the cell. The deletion mutants of *PpABCB14* produced rounder cells compared with those of the wild-type plants. Furthermore, the induced expression of mClover3-PpABCB14 led to altered leaf cell shapes. Taken together, these results suggest that the optimal regulation of PpABCB14 is crucial for proper anisotropic cell expansion.

The morphological resemblances observed in *PpABCB14* deletion mutants and previously reported cuticle-deficient mutants in *P. patens* led me to investigate the integrity of the cuticle, although the B-type ABC transporters have not been reported to transport substrates for cuticle formation. Toluidine blue staining revealed that the cuticles of deletion mutant gametophores were compromised, failing to prevent dye penetration into the cells. Transmission electron microscopy further confirmed a significant reduction in the cuticle proper of the mutants. Lipophilic dye FY-088 staining revealed a respective reduction and increase of surface lipids, compared with wild-type plants, in *PpABCB14* deletion and overexpression plants. These results collectively suggest the role of PpABCB14 in translocating certain components to the cell surface for cuticle formation. To identify potential lipid substrates of PpABCB14, the lipid profiles of cutin monomers and cuticular waxes were quantified using gas chromatography-mass spectrometry. The results showed a general reduction of cutin monomers and waxes in the deletion mutant plants, suggesting a function of PpABCB14 to export components that anchor the surface lipids to the cell wall.

Collectively, these findings indicate that PpABCB14 contributes to plant cuticle formation by transporting a yet-to-be-identified substrate to the cell surface as it expands, and this action alleviates the cuticular constraints on cell expansion. This cuticle-based regulatory mechanism complements cell wall polysaccharide-based mechanisms to control cell expansion direction and ensures cuticle integrity, which is critical for plant morphogenesis.

## 博士論文審査結果

<sup>Name in Full</sup>  
氏名 Zhang, Liechi

<sup>T i t l e</sup>  
論文題目 Functional analysis of ABCB14 in *Physcomitrium patens* reveals a regulatory mechanism for anisotropic cell expansion through cuticle deposition (ヒメツリガネゴケの ABCB14 の機能解析から明らかになった、クチクラ沈着を介した細胞の異方成長を制御する分子機構)

植物細胞は細胞壁でおおわれているため、細胞伸長方向と伸長量の適切な制御が器官形成に重要である。植物細胞の異方性伸長は、主にセルロース、ヘミセルロース、ペクチンなどの多糖類からなる細胞壁の力学的異方性によって担われている。これらの多糖類やそれらの相互作用を変えることによって、細胞壁の力学的性質が変化し、異方伸長部位が制御されている。一方、陸上植物の共通祖先は、地上組織の外界に面した細胞壁を覆う疎水性のクチクラを獲得することで、地上進出が可能になったと推定されている。細胞壁多糖類に加え、クチクラも引張応力により、機械的に細胞や器官の伸長を制約している。このような機械的伸長制約はクチクラの供給によって緩和される。しかし、細胞や器官を適切に伸長させるため、クチクラの時空間的供給をどのように制御しているかは未解明であった。Liechi Zhang 氏は、コケ植物ヒメツリガネゴケ *Physcomitrium patens* の ATP 結合カセット (ABC) トランスポーター B14 遺伝子の機能解析を通して、この問題に取り組んだ。

ABC トランスポーターは、真核生物において細胞膜を通して基質を輸送することが知られている。被子植物の B 型 ABC トランスポーター (ABCB) の多くは植物ホルモンであるオーキシンのトランスポーターとして機能しているが、中には、シロイヌナズナの ABCB14 (AtABCB14) のように複数の基質に親和性を示すものも知られている。Zhang 氏は、ヒメツリガネゴケゲノムに、2つの *AtABCB14* オルソログ遺伝子があることを見つけ、遺伝子欠失体の作出を試みた。片方の遺伝子は複数回の実験にも関わらず、欠失変異体を得ることができなかったが、もう一方の *PpABCB14* と名づけた遺伝子について遺伝子欠失変異体を得ることに成功した。この変異体は、茎葉体の葉形成に異常が生じ、葉が縮れていた。そこで、Zhang 氏は、PpABCB14 タンパク質の葉発生過程における局在を調べるため、相同組換えにより、蛍光タンパク質 mClover3 遺伝子を *PpABCB14* 遺伝子の開始コドンの直前に挿入し、mClover3-PpABCB14 融合タンパク質の葉形成過程における動態を観察した。その結果、mClover3-PpABCB14 融合タンパク質は、葉細胞の異方性伸長部位に局在することを明らかにした。さらに、異方性伸長部位が変化する葉成長過程において、mClover3-PpABCB14 融合タンパク質は、異方性伸長に先立って伸長部位に局在し、融合タンパク質の局在量と局所伸長速度に正の相関があることを明らかにした。そして、*PpABCB14* 欠失変異体は、細胞形態の観察から、局所伸長に異常が生じ、均等に近い丸い細胞を形成すること、mClover3-PpABCB14 融合タンパク質を野生型で誘導異所発現

させると、葉細胞形態が変化することを示した。これらの結果から、PpABCB14 タンパク質の局在部位の適切な制御が、異方性細胞伸長に必要であることがわかった。

研究の過程で、Zhang 博士は、*PpABCB14* 欠失変異体の形態が、クチクラ欠損変異体に類似していることに気づいた。そして、トルイジンブルーを外生投与すると、クチクラ欠損変異体同様、細胞内にトルイジンブルーが浸透することを発見した。また、透過電子顕微鏡観察より、欠失変異体ではクチクラ層が減退していることを確認した。さらに、親油性色素 FY-088 を外生投与すると、欠失変異体では細胞表面脂質の減少、異所発現誘導体では増加が認められた。これらの結果から、PpABCB14 がクチクラ形成のための特定の成分を細胞表面に輸送する役割を担っていることが示唆された。そこで、PpABCB14 が輸送する基質脂質候補を探索するため、クチクラを構成する、クチンモノマーとワックスの脂質プロファイルをガスクロマトグラフィー質量分析法によって定量解析した。その結果、欠失変異体ではクチンモノマーとワックスが全般的に減少しており、PpABCB14 が表面脂質を細胞壁に固定するような成分を輸送している可能性が示唆された。

これらの結果から、PpABCB14 は細胞異方性伸長時に、表面脂質を細胞壁に固定するような物質を細胞表面に輸送し、これによってクチクラの局所的増加を導き、その部位の機械的制約を緩和することで、植物細胞の異方性伸長を引き起こしていることが示唆された。この発見は、従来知られていた細胞壁多糖類を介した異方性伸長機構と、今回発見されたクチクラ制御を介した異方性伸長機構が統合することによって、植物細胞の形態形成が担われていることを明らかにした点で、植物器官発生の細胞レベルでの制御メカニズムを理解する上で重要な基盤を与えるものである。

以上より、審査委員会は、本論文が学位の授与に値すると判断した。