

氏 名	段 中瑞
博士の専攻分野の名称	博士（理学）
学位記号番号	博理工甲第972号
学位授与年月日	平成27年3月24日
学位授与の条件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	Molecular and genetic studies of the plasmodesma formation in sugar translocation pathway in <i>Arabidopsis thaliana</i> : Photoassimilate translocation is promoted by constructing plasmodesmal connections in <i>Arabidopsis</i> grown under increased atmospheric CO ₂ concentration (糖転流経路の原形質連絡形成機構に関する研究：高CO ₂ 環境下では糖転流経路の原形質連絡形成が促進される)
論文審査委員	委員長 教授 西田 生郎 委員 教授 西山 佳孝 委員 教授 高木 優 委員 准教授 日原由香子

論文の内容の要旨

Sucrose, the primary assimilate by photosynthesis, is translocated from source leaves to sink organ via the phloem. Phloem loading involves apoplastic pathways that regulated by sucrose transporters (*SUC2*, *SWEET12* and *SUT4*) and symplastic pathways, which depend on plasmodesmal connections to the phloem or the companion cell (CC)-sieve element (SE) complex. The intercellular communication via plasmodesmata plays an important role in cell-to-cell transport. However, neither the molecular mechanisms of plasmodesmal formation nor the physiological significance plasmodesmata for sugar translocation is well understood.

In this thesis, using T-DNA-tagged *restricted sucrose export1 (rsx1)* mutants of *Arabidopsis thaliana*, which exhibited mature leaf-specific sugar accumulation, I reveals restricted photoassimilate translocation by comparing with wild-type plants. Transgenic *rsx1-2* plants expressing RSX1 fused with synthetic green fluorescent protein (RSX1-sGFP) displayed colocalization with aniline blue stains for plasmodesma-associated callose in vasculature wall regions. I also showed that *suc2-5 rsx1-2* mutants show more diminished growth than did the *suc2-5* mutants of an essential sucrose transporter, suggesting that RSX1-dependent symplastic connections might also important for the growth of *suc2-5* mutants. Secondly, I evaluated that ¹⁴CO₂-photoassimilation and translocation significantly enhanced in 18-d-old wild-type plants grown under high (780 ppm) CO₂ concentration. The transcript levels of sucrose transporter genes suggested upregulation of SWEET12-SUT4-dependent apoplastic phloem loading in wild-type plants under high CO₂ concentration. Furthermore, RT-PCR revealed that the transcript levels of *RSX1* were upregulated in source leaves of wild-type CO₂ plants under high CO₂ concentration. The number of aniline blue-stained spots increased in the midrib wall of the first leaf. These results suggest that RSX1 is likely to promote plasmodesmal development in *Arabidopsis* under an increased atmospheric CO₂ concentration, which then promotes efficient phloem loading of excess sugar.

論文の審査結果の要旨

段中瑞氏（申請者）の提出した学位論文について本学位論文審査委員会は、平成27年2月10日（水）13:00～13:40に埼玉大学理学部3号館第3会議室において公開で論文発表会を開催した。その後、13:40～14:40に詳細な質疑応答を行って内容を審査した。本学位論文審査委員会が行なった学位申請者による発表とそれに続く質疑および執筆論文内容の審査の結果を、以下に要約する

陸上植物が成長するためには、光合成の場であるソース葉(糖の供給源)からシンク組織(代謝や貯蔵の場)へ、光合成同化産物であるショ糖を篩管を經由して転流する必要がある。葉は、展開直後は、ショ糖を輸入するシンク（シンク葉）であるが、成長に従いショ糖を自ら合成し、さらにシンク組織に転流できるソース葉に転換する。このとき、ショ糖転流機能を担う維管束では、細胞間の連絡通路である原形質連絡の修飾や新規形成がおこることが知られている。このような修飾・新規形成の原形質連絡は、葉のソース化に伴い生産性の高まったショ糖を効率よくシンク組織に転流させるために必要であると推定されているが、修飾・新規形成される原形質連絡の意義と、形成のメカニズムについてはよくわかっていない。

当研究室の矢野はソース葉に特異的にアントシアニンやデンプンが蓄積する *restricted sucrose export1 (rsx1)* 変異株を単離している。これまでの研究では、*RSX1* プロモーター GUS 植物の発現パターン解析により、*RSX1* がソース葉の維管束篩部に発現し、糖転流経路構築に関わる因子であると推測されていた。段中瑞は、*rsx1* 変異株を用いた逆遺伝学的解析と分子生物学解析から、以下に述べるように、*RSX1* がソース葉における修飾・新規形成原形質連絡の構築にかかわり、糖転流活性を支配すること、ならびに、高 CO₂ 環境に応答して *RSX1* が発現し、原形質連絡を新規に形成し、転流を促進することをあきらかにしている。

第一章は序論であり、植物や一部の藻類に発達した細胞間の連絡通路である原形質連絡について、その構造上の特徴をまとめ、発生学的に一次原形質連絡と二次原形質連絡に分けられることを紹介している。次に、二次原形質連絡は枝分かれ構造が複雑で、葉のソース化に伴い糖転流経路で形成されることを紹介している。また、ソース葉から篩管へのショ糖積み込み経路としてのシンプラスト経路とアポプラスト経路の違い、および植物の高 CO₂ 環境応答と光合成抑制について概説している。

第二章は、本論文の中心をなすが、その内容は現在、Plant Cell 誌に再投稿を準備中である。本章では、*rsx1* 変異株の転流活性を評価し、¹⁴CO₂ でラベルしたソース葉からシンク組織への、放射性同化産物の転流活性が低下していることをあきらかにしている。また、*rsx1* 変異株では、同化産物だけでなく、GFP タンパク質の転流活性も低下することをあきらかにしている。さらに、これらの転流活性の低下は、電子顕微鏡解析から、*rsx1* 変異株の維管束篩部における原形質連絡の形成不全が原因であることが明らかであり、また、不完全な原形質連絡は、*rsx1* 変異株に *RSX1*-sGFP タンパク質を発現させることで回復することを示している。*rsx1 ProRSX1 : RSX1-sGFP* 植物では、維管束細胞内の GFP 蛍光の局在観察が可能であり、その結果、*RSX1* が小胞体経路で原形質連絡に配置されることが示唆されている。また、イムノゴールドの局在解析から、*RSX1*-sGFP は原形質連絡に共局在することもあきらかにしている。以上の結果は、*RSX1* は糖転流経路で形成される原形質連絡の形成において重要な役割を果たし、転流活性を制御する重要な因子であることを示している。

第三章では、植物の高 CO₂ 環境への応答で、ソース葉における転流活性が強化される必然性について論じ、その中で、シロイヌナズナの第1葉と第3葉で、光合成活性の強化および転流活性の強化が、葉序特異的に起こることをあきらかにしている。特に、高 CO₂ 環境では、*SWEET12* ショ糖ファシリテータと *SUT4* トランスポータの発現がソース葉で高まるのに対し、通常大気下で主要な役割を果たす *SUC2* トランスポータの発現レベルは変化しないことを見いだしている。また、高 CO₂ 環境で発達したシロイヌナズナ第1葉では、葉柄

の維管束の伴細胞 - 篩要素間に原形質連絡の新規に形成され、転流活性を向上させることを見いだしている。SUT4がアポプラスト経路の篩部積み込みで重要であることは、過去の研究でいったん提案されたもの、その後、相反するデータにより否定されていた経緯があるが、段の研究は、SUT4のはたらきを、アポプラスト経路の篩部積み込みにおいて復活させたものであり、その成果を発表した Plant Cell Physiology 誌の論文は、その号のハイライトとして取り上げられたほか、英国の John Patrick からは、Faculty1000 Plant Biology に取り上げられている。このほか、未発表のデータとして、高 CO₂ 環境で発達する原形質連絡の形成には、RSX1 発現が関与すること、RSX1 を利用した糖転流活性の改善など、新規の知見を得ている。

以上のように、段の研究は、糖転流経路における原形質連絡の修飾・新規形成と、転流活性制御において、ブレイクスルーといえる研究成果を上げており、本論文は博士（理学）の学位論文に値する論文であると認められる。