

所属 (主指導教官)	遺伝子教育センター 植物細胞工学領域 (佐野 浩 教授)		
氏名	梁 勝煥	提出	平成 14 年 1 月 8 日
題目	Studies on expression of senescence-associated genes and physiological function of protein products in tobacco plants. (タバコにおける老化関連遺伝子の発現と生理機能に関する研究)		

Senescence is a highly organized process under genetic control that is not only age-dependent, but is also induced by environmental conditions such as shading, low temperature, dehydration and pathogen infection. During senescence, chloroplasts and other cellular organelles are dismantled, and macromolecules such as chlorophyll, lipids, proteins and nucleic acids are degraded. Many senescence-associated genes (SAGs), which are defined as up-regulated ones during senescence, have been isolated and characterized. However, many SAGs have functions that remain unknown.

In this study, I describe analysis of expression and physiological roles of SAGs from tobacco plants. This thesis consists of 4 chapters; Chapter I describes isolation and characterization of *Ntdin* encoding a protein involved in molybdenum metabolism; Chapter II describes isolation and characterization of *tbzF* and *tbz17*, genes encoding bZIP transcriptional activators; Chapter III describes promoter analysis of *tbzF*; Chapter IV describes isolation of TBZF interaction factors by yeast two-hybrid system.

In Chapter I, I characterized *Ntdin*, of which transcripts are induced by darkness and during senescence. *Ntdin* is related to Radish *din1* and Arabidopsis *sen1*. Its product, Ntdin, consists of 185 amino acids, and shows 56.8% and 54.2% similarities to Atsen1 and Rsdin1, respectively. It also shows some similarity with the C-terminal region of *N. plumbaginifolia* Cnx5, which has a function in molybdenum cofactor (Moco) biosynthesis. Ntdin-GFP fusion protein was found to localized in chloroplasts. Transcripts of *Ntdin* are induced by sulfate and nitrate but not by phosphate. Tobacco plants expressing an antisense *Ntdin* gene showed decreased molybdoenzyme activity due to a deficiency of Moco, suggesting that Ntdin functions in Moco biosynthesis.

In Chapter II, I characterized two bZIPs, TBZF and TBZ17, belonging to the LIP19 subfamily. Transcripts of *tbzF* were detected at high level in senescing leaves and flowers. In contrast, *tbz17* transcripts accumulated in aging leaves but not in flowers. *In situ* hybridization analysis revealed transcripts of *tbzF* and *tbz17* to be predominantly located in guard cells and vascular tissues of senescing leaves. TBZF and TBZ17 show 73% identity each other and are located in the nucleus. Bacterially expressed proteins preferentially bound to DNA fragments spanning A-box/G-box and C-box/G-box hybrid motifs, and showed transactivation activity in co-transformed tobacco BY2 cells, confirming that they function as transcriptional activators. These results suggest that TBZF and TBZ17 are both involved in controlling transcription of genes functioning in guard cells of senescing leaves and that TBZF bifunctionally acts in floral development.

In Chapter III, I examined whether or not expression of *tbzF* is differentially regulated in response to different physiological conditions. I isolated a 1740 bp promoter region, and fused it to the β -glucuronidase (GUS) reporter gene, which was introduced into tobacco plants. Resulting transgenic plants exhibited GUS activity in the stomatal guard cells of senescing leaves and in flower buds, and also in ABA- and ethylene-treated young leaves. To identify *cis*-responsive regions, four deletion constructs were made and transformed into tobacco plants. GUS assays revealed that the *cis*-element for senescence is located on a different region from that for flower development.

In Chapter IV, I describe identification of genes encoding proteins that interact with TBZF by yeast two-hybrid screening. Among several clones, one particular clone was found to encode a protein that predominantly interacts with TBZF, and designated TIP (TBZF interacting protein). *TIP* encodes a 13-kD basic protein, which is localized in the nucleus, and is expressed upon water deficit and during fruit ripening. Expression of *TIP* homologous was also seen in different tissues and in response to cold, ABA and various other stress treatments.

Based on these observations, I concluded that Ntdin functions in providing molybdenum ions to senescence-associated proteins such as NR, and that, TBZF, TBZ17 and TIP are key regulators of multiple genes, of which activation is important for senescence processes.

論文審査結果の要旨

申請者氏名 Yang Seung-Hwan (梁 勝 煥)

植物の老化は、年齢に生理的な加齢に依存するだけでなく、遮光、低温、乾燥および病原体感染のような環境条件によっても引き起こされる。遺伝的制御下で高度に組織化されたプロセスと言えよう。老化中に、葉緑体や他の細胞内小器官は分解され、葉緑素、脂質、蛋白質、核酸などの巨大分子は減少する。それらは特異酵素群によって触媒され、それぞれをコードする遺伝子は老化中に発現調節を受ける。しかし、多くの老化関連遺伝子(SAG)が単離されたにもかかわらず、それらの機能は未知のままである。本研究では、タバコの SAG の発現と生理的役割について解析した。第 I 章では、暗処理と老化で発現誘導される *Ntdin* の特徴づけをおこなった。*Ntdin* 蛋白質 (185 アミノ酸) は、モリブデンコファクター(Moco)生合成において機能する *N.plumbaginifolia* Cnx5 の C 末端領域と相同性を示した。*Ntdin*-GFP 融合蛋白質は葉緑体に局在した。アンチセンスを発現させたタバコでは、molybdoenzyme の活性が減少した。これらの結果から *Ntdin* は老化に伴う養分転流にかかわる酵素群にモリブデンを供給する機能をもつ、と推定された。第 II 章では、2 つの bZIP、TBZF と TBZ17 の特徴づけを行った。*tbzF* は老化葉と花で発現し、*tbz17* は老化葉で発現するが、花では発現しなかった。両者とも老化葉の孔辺細胞と維管束で発現し、核に局在する。転写因子として機能することも分かった。これらの結果から TBZF と TBZ17 は老化葉の孔辺細胞で機能する遺伝子の転写を制御し、TBZF は花の発生過程でも機能することが示唆された。第 III 章では、1740bp のプロモーター領域を単離し、 β -グルクロニダーゼ(GUS)をリポーターとしてタバコでの活性を測定した。老化葉の孔辺細胞と花芽、ABA やエチレン処理した若い葉で GUS 活性が見られた。4 つの欠失コンストラクトの解析から、老化に応答する領域と花に応答する領域は異なることが示された。第 IV 章では、TBZF と相互作用する蛋白質 NtTIP1 を単離した。NtTIP1 は 12.5-kDa の蛋白質で、核に局在し、乾燥や果実成熟中に発現誘導される。*NtTIP1* のホモログは、いくつかの植物から単離されており、低温、ABA やに応答して発現することが示されている。しかし、その機能は知られておらず、bZIP の制御に関わることを、示した本研究結果はこのグループの解析を強く促進するものである。

以上のように、本論文はな老化関連遺伝子の制御について多くの新しい知見を与えるもので、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。