

イネ低温誘導性遺伝子の分子生物学的研究

Molecular Biological Approach toward Rice Low-Temperature-Induced Genes

(研究者)

(代表研究者) 草野 友延 秋田県立農業短期大学付属生物工学研究所・助教授

Tomonobu Kusano, Biotechnology Institute, Akita Prefectural College of Agriculture

(協同研究者) 菅原 和幸 (Kazuyuki Sugawara) 秋田県立農業短期大学付属生物工学研究所・技官

### Summary

We have isolated the low-temperature-induced rice gene, lip19, which encodes a bZIP (basic region/ leucine zipper) protein. Using this gene as a probe, the maize homolog, m<sub>lip15</sub>, was isolated. mLIP15 and its truncated derivatives, produced in rabbit reticulocyte lysates or in Escherichia coli expression system, bind to the G-box and hexamer sequences which are known to be cis-acting elements in plant. These results lead to the conclusion that the m<sub>lip15</sub> is a strong candidate gene for low-temperature-induced transcriptional factor in maize.

#### 4-1. 研究目的

イネ低温誘導性遺伝子として単離した3種のうち、lip19の遺伝子産物(LIP19)が塩基性アミノ酸にとむ塩基性領域に隣り合ってロイシン・ジッパー構造を持つbZIP群の蛋白質であることが判明した。このことはLIP19が低温で誘導される転写因子である可能性を強く示唆する。従って、本研究ではlip19およびlip19のトウモロコシ相同性遺伝子m<sub>lip15</sub>を軸に上流および下流の反応を明らかにする事を、目的とした。

#### 4-2. 研究経過および成果

イネの耐寒性品種を育成するためには、低温がイネにあたる影響を分子生物学的レベルで理解することが必要であると考えた。研究の糸口を得る為に、低温誘導性のcDNAをイネ胚盤由来の培養細胞より単離した。得られた3種のクローンをlip5, lip9そしてlip19と名付けた。遺伝子名はgene encoding low-temperature-induced proteinに因る。これら3種のクローンは植物ホルモンのアブシジン酸の処理で誘導されるが、浸透圧ショックでは影響

を受けなかった。塩基配列解析の結果、lip5は新規の遺伝子であること、一方lip9遺伝子産物はLEA(late embryogenesis abundant)蛋白質に相同性を示すことが分かった。さらに興味深いことにはlip9が低温により誘導される転写因子をコードしている可能性を示唆する結果が得られた。したがって、以後の実験はlip9およびその遺伝子産物であるLIP19を中心にを行った。

lip9はカルスより分離されたが、イネ幼植物体を使った実験から器官特異性はなく葉でも根でも低温処理によって誘導され、常温に戻すと転写物が検出されなくなることを確認した。lip9の発現は20℃-15℃の間の温度で誘導され始めること、低温による誘導は一過性ではなく低温処理の続いている間転写物のレベルが高く維持されること、そして常温にもどして2時間後には転写物は完全に分解され検出されないことが判明した。前述のように高温への温度シフトでは発現は全く起こらない、故にlip9の発現は低温により正に制御されると結論した。

一次構造の解析から、lip9は552塩基対の長い5'非翻訳領域に続き447塩基対の蛋白質をコードする領域をもつこと、トウモロコシのOBF1遺伝子と高い相同性(53.5%)を示すこと類推される産物が塩基性領域に隣り合った7残基毎のロイシンの繰り返し構造をもついわゆるbZIP蛋白質であることが明らかとなった。OBF1遺伝子はオクトピン合成酵素遺伝子のエンハンサーに結合する因子1をコードする。そしてOBF1蛋白質もbZIP蛋白質群に属する。lip9遺伝子産物(LIP19)はOBF1蛋白質のアミノ酸配列の一部とも高い相同性(アミノ末端側の72残基間で55.6%)を示した。イネゲノムDNAのサザン解析とlip9ゲノムクローンの分離そして構造解析により、lip9はイネゲノムDNAあたり1コピー存在すること、非翻訳領域、翻訳領域を問わずイントロンを含まないことが示された。以上の結果を論文①にまとめた。

lip9がトウモロコシのOBF1遺伝子と高い相同性を示した事実は、トウモロコシにおけるlip9相同性遺伝子に対する興味を引き起こした。そこで低温処理したトウモロコシよりcDNAライブラリーを調製し、分離を試みた。13ケのlip9と反応するクローンを得たが全て同一の遺伝子であること、既報のいずれのbZIP蛋白質とも独立であることが分かり、mlip15と名付けた。OBF1遺伝子とは転写物のサイズ等、種々の点で異なる。得られた最長のcDNAは1179塩基対からなり、135アミノ酸残基からなる非常に小さなbZIP蛋白質をコードしていること、lip9とはDNAレベルで61.4%、アミノ酸レベルで68.9%の相同性を示すことが明らかとなった。mlip15は当然の事ながら、lip9と同様に低温により正に制御されていた。他のストレスの影響を調べた所、乾燥処理と高温処理は全く影響がなく、嫌気処理によってもほとんど影響を受けない。塩処理とABA処理は低温処理と同様にmlip15の発現を引き起こした。遺

伝子産物のコード領域の同定が正しいことを試験管内の転写-翻訳系で確認してmLIP15と名付けた。イネLIP19とトウモロコシmLIP15を比較すると、DNA結合に関与するといわれている塩基性領域部分は両者とも全く同じアミノ酸配列をもっていること、ロイシンジッパー部分は両者共9回の7残基毎のロイシンをもつこと、但しイネでは3番目、4番目、5番目がバリン、チロシン、バリンになっており、トウモロコシでは3番目、5番目そして6番目がスレオニン、バリン、バリンになっていることがわかった。実際にウサギ網状赤血球無細胞系や大腸菌の発現系で生産したmlip15蛋白質を用い、DNA結合性をゲルシフトアッセイで検討した所、mLIP15は植物におけるシス配列として知られるG-box(5'-CACGTG-3')やhexamer(5'-ACGTCA-3')配列に強く結合し、OBF1蛋白質が強く結合するocs配列には非常に弱くしか結合しないことも明らかにした。結合反応を30℃と4℃で行った所、いずれでも結合が起こり、より30℃での結合産物が多かった。故に結合反応自体は低温に依存していないと思われる。こうした事実から、mLIP15が低温誘導性の転写因子である可能性が強く支持された。

一般にbZIP蛋白質はホモ2量体でDNAと結合するが、動物のFos/Junでよく知られるようにヘテロ2量体で結合する例が示されている。植物においてもシロイヌナズナのGBF蛋白質、パセリのCPRF蛋白質そしてトウモロコシのO2蛋白質などで、ヘテロ2量体形成が報告されている。そこでmLIP15がOBF1とヘテロ2量体を形成しDNAに結合するかどうかを検討した。結果は予想どおりヘテロ2量体を形成した。

ところでイネのLIP19蛋白質は種々の検討にもかかわらず、上述のいずれのDNA配列にも結合しない。現在、mLIP15とLIP19のロイシンジッパー部分を交換した分子キメラを作成し、DNA結合性を検討するべく準備をすすめている。またmLIP15の真の標的遺伝子(群)を同定することを現在行っている。

末尾ながら、本研究をご支援くださいました財団法人日産科学振興財団に心より感謝の意を表します。

#### 4-3. 発表論文

##### 4-3-1. 学術論文

①Aguan, K. et al.(1993)

Low-temperature-dependent expression of a rice gene encoding a protein with a leucine-zipper motif. *Mol. Gen. Genet.* 240, 1-8.

②Kusano, T. et al.(submitted)

A maize low-temperature-induced DNA binding factor of bZIP family.

#### 4-3-2 口頭発表

①Kusano, T. et al.(1994)

A low-temperature-induced gene encodes a putative transcription factor in maize. 32nd NIBB conference (Okazaki, 於 基礎生物学研究所)

②菅原和幸・トーマス ベルベリッヒ・鈴木信弘・クリパモイ アグアン・草野友延(1994)

低温誘導性転写因子をコードするトウモロコシ遺伝子 植物生理学会 (於 筑波大学)

#### 4-3-3. 和文誌(解説記事)

①草野 友延「低温で誘導される植物の遺伝子-イネLIP19は低温誘導性の転写因子か?」

化学と生物 31巻:629-631(1993)

②草野 友延「植物における低温誘導性遺伝子」

種生物学研究 17巻:33-41(1993)

③草野 友延・トーマス ベルベリッヒ「低温誘導性遺伝子とその機能」

日本醸造協会誌 89巻:505-512(1994)