

新基因水稻 *OsLSD1* 的克隆及拟南芥和水稻类 *LSD1* 基因家族的生物信息学分析*

王丽娟^{1,2)} 田颖川¹⁾ 何朝族^{1)**}

(¹⁾中国科学院微生物研究所, 植物基因组学国家重点实验室, 北京 100080;

²⁾中国科学院研究生院, 北京 100039)

摘要 类 *LSD1* (*LSD1*-like) 基因家族是一类特殊的 C2C2 型锌指蛋白基因, 编码植物特有的转录因子. 目前已经研究的 2 个成员拟南芥 *LSD1* (lesions stimulating disease resistance 1) 和 *LOL1* (LSD-One-Like 1) 基因均参与植物细胞程序化死亡 (programmed cell death, PCD) 的调控. 从水稻 cDNA 文库中克隆到 1 个类 *LSD1* 基因, 命名为 *OsLSD1*. 该基因长 988 bp, 包含一个 432 bp 的开放阅读框, 推导的氨基酸序列 (143 个氨基酸) 含有 3 个内部保守的锌指结构域. DNA 印迹结果表明 *OsLSD1* 基因在水稻基因组中为单拷贝, 且在根、茎和叶中表达. 借助于生物信息学分析技术, 从拟南芥和水稻数据库中各识别出 5 个和 7 个 (包括 *OsLSD1*) 类 *LSD1* 基因. 分析了这些类 *LSD1* 基因的结构, 蛋白质结构域组成. 系统进化分析表明, 无论基于编码区的核苷酸或氨基酸序列都可以将这些类 *LSD1* 基因分为 2 类. 虽然不存在拟南芥或水稻特有的类 *LSD1* 蛋白, 但有些结构域是水稻所特有的, 也有些基因是来源于复制事件.

关键词 类 *LSD1* 基因, 锌指结构域, 细胞程序化死亡 (PCD), 系统发生, 基因复制

学科分类号 Q

植物细胞程序化死亡涉及到复杂的信号转导网络, 对植物的生长、发育和抗病极其重要^[1]. 其中, 转录因子在调节植物防卫基因表达和抗性反应上起关键作用. 锌指蛋白是真核生物基因组最丰富的一类转录因子, 这种蛋白质与 Zn^{2+} 结合形成稳定的“手指”结构, 在基因的表达调控、细胞分化、胚胎发育等生命过程中发挥重要作用^[2]. 根据半胱氨酸 (C) 和组氨酸 (H) 残基的数目和位置, 可将含锌指结构域的转录因子分为 C2H2, C2C2, C3H, C3HC4 (RING finger), C3HC5 (LIM finger) 5 个亚类^[3]. C2C2 型锌指由 4 个半胱氨酸残基结合一个 Zn^{2+} . 在拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 和水稻 (*Oryza sativa*) 中, C2C2 型锌指蛋白分别占转录因子总数的 6.78% 和 4.67%^[4, 5], 由 GATA, CO-like, Dof, YABBY 和类 *LSD1* 5 个基因家族组成, 其中后 4 个家族是植物特有的^[6, 7]. 类 *LSD1* 基因编码一类特殊的 C2C2 型锌指蛋白, 其锌指结构域由 25 个保守的氨基酸残基组成.

类 *LSD1* 基因家族已克隆的第一个成员是拟南芥的 *LSD1* 基因, 它接受由程序化死亡细胞发出的信号后, 通过上调铜锌过氧化物歧化酶 (CuZnSOD) 来限制细胞死亡的扩展^[6, 8]. Eppele 等^[9] (2003 年) 在拟南芥基因组上鉴定出 2 个类 *LSD1* 基因 *LOL1* 和

LOL2, 其中 *LOL1* 与 *LSD1* 一起通过拮抗作用调节 CuZnSOD 的积累来决定细胞的命运.

双子叶模式植物拟南芥的全基因组和单子叶模式植物水稻 (粳稻 *Oryza sativa* ssp. Japonica 和籼稻 *Oryza sativa* ssp. Indica), 基于鸟枪法测序的基因组已经完成^[4, 5, 10], 加上水稻 (*Oryza sativa* ssp. Japonica) 全长 cDNA 数据库的释放^[11], 为系统分析类 *LSD1* 基因提供了数据基础, 并可以研究拟南芥和水稻由于进化途径的不同而造成的差异. 粳稻鸟枪法测序的基因组标注中包含 6 个拟南芥 *LSD1* 的同源基因^[9], 迄今为止, 这几个基因的功能尚未被实验鉴定, 它们在细胞中的作用仍不清楚. 水稻与拟南芥同源基因的比较生物学分析, 将有助于推测水稻中的类 *LSD1* 锌指蛋白的功能, 为进一步研究提供线索.

我们从水稻 cDNA 文库中克隆到了一个类 *LSD1* 基因, 命名为 *OsLSD1*. 对该基因在基因组中的拷贝数和表达模式进行了分析, 从拟南芥和水稻

*国家重点基础研究发展规划项目 (973) (G2000016203) 和国家自然科学基金资助项目 (30270706).

** 通讯联系人.

Tel: 010-62642536, E-mail: hecz@sun.im.ac.cn

收稿日期: 2004-09-28, 接受日期: 2004-10-15

数据库中各搜索到 5 个和 7 个类 *LSD1* 基因, 并对这些基因进行了生物信息学分析, 其目的在于: a. 对比与分析拟南芥与水稻类 *LSD1* 基因在数量、基因结构和蛋白质结构域上的差异; b. 通过系统进化分析来确定拟南芥和水稻各类 *LSD1* 基因的同源关系, 并讨论利用直系同源基因来进一步分析基因功能的可行性。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 植物. 各水稻品种为本实验室保存。

1.1.2 工具酶与试剂. 各种限制性内切酶和 *Taq* DNA 聚合酶购自 Takara 公司; Trizol 试剂购自 GibcoBRL; RT-PCR kit 购自 Invitrogen 公司; 同位素 α - 32 P-dCTP 购自 Amersham Pharmacia(UK)公司; Primer-a-Gene Labeling System 购自 Promega 公司。

1.1.3 PCR 引物. *OsLSD1* 基因片段引物 *OsLSD1*-F 为 5' CGCAGTTTGCAGTACCGTGAC 3'; *OsLSD1*-R 为 5' AGCTGCTGGGCTTCTGGTCTA 3', 用这对引物应扩增出 296 bp 片段. 肌动蛋白(actin) 引物为 actin-F: 5' TCGGAATGGGCCAG AAGGAC 3'; actin-R: 5' TCCACGTCGCACTT CATGATG 3', 扩增片段大小为 730 bp. 上述引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 *OsLSD1* cDNA 的获得. 对本实验室构建的水稻 cDNA 文库进行随机测序, 得到了一个与拟南芥 *LSD1* 基因同源性较高的水稻 cDNA 克隆, 命名为 *OsLSD1*. 该 cDNA 序列在文献[11]中也有报道。

1.2.2 DNA 印迹分析. 水稻叶片总 DNA 的提取参照文献[12]. 约 20 μ g 总 DNA 用 *Bam*H I, *Eco*R I 和 *Hind* III 彻底酶解后, 在 1.0% 琼脂糖胶上电泳, 将胶上的 DNA 转移至 Hybond-N⁺ 膜上. 探针为 *OsLSD1*-F、*OsLSD1*-R 引物扩增的 *OsLSD1* 基因片段, 经纯化后按 Primer-a-Gene Labeling System (Promega 公司) 提供的方法用 α - 32 P-dCTP 予以标记. 按文献[13]提供的方法进行杂交。

1.2.3 水稻叶片总 RNA 的提取及 RT-PCR 检测. 用 Trizol 试剂分别提取水稻根、茎和叶的总 RNA, 测定 RNA 含量, 电泳检测 RNA 完整性. 按 RT-PCR 试剂盒提供的方法进行反转录, 得到第一链 cDNA, 作为 PCR 扩增的模板。

1.2.4 序列选择. 基因结构和染色体定位.

用对应拟南芥 *LSD1* 锌指结构域的氨基酸片段

(25 aa, Pfam profile PF06943) 来查询 TIGR 的拟南芥数据库 (<http://www.tigr.org/tdb/e2k1/ath1/index.shtml>), 得到非冗余的拟南芥类 *LSD1* 基因, 并获得其基因结构和染色体定位的信息。

对于水稻中的类 *LSD1* 基因, 我们用上述序列搜索了相关的 4 个数据库: KOME 的粳稻全长 cDNA 数据库 (<http://cdna01.dna.affrc.go.jp/cDNA/Wblast.html>), TIGR 的粳稻蛋白质数据库 (<http://tigrblast.tigr.org/euk-blast/index.cgi?project=osa1>), Syngenta 的粳稻全基因组鸟枪法测序数据库 (<http://www.tmri.org/>), 北京基因组研究所的籼稻全基因组鸟枪法测序数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Genome/PlantBlast.shtml?7>). 基因结构和染色体位置从上述数据库中获得。

1.2.5 序列分析和系统发生分析. 根据 SMART^[14]和 Pfam^[15]数据库对蛋白质序列的保守结构域进行标注, 按其出现的顺序在蛋白质名称后面加“-1, -2, -3”来命名各锌指结构域. 多序列比对采用 Clustal X 软件^[16]完成, 置换矩阵为 BLOSUM62, 并手工校正比对结果. 用 Neighbor-Joining (NJ) 方法构建进化树, 并做 500 次 bootstrap 检验。

2 结 果

2.1 水稻 *OsLSD1* 基因的分离和鉴定

通过对水稻 cDNA 文库进行测序和分析, 我们获得了一个与拟南芥 *LSD1* 基因有较高同源性 (58%) 的 cDNA 克隆 (GenBank 登录号: AY525368), 命名为 *OsLSD1* (*Oryza sativa LSD1*). 该 cDNA 长 988 bp, 包括 189 bp 组成的 5' 非翻译区和 367 bp 的 3' 非翻译区. 432 bp 的开放阅读框 (ORF) 可翻译成含 143 个氨基酸的蛋白质, 预测分子质量为 14.8 ku, 含有 3 个内部保守的 C2C2 型锌指结构域. BLASTN 搜索表明 *OsLSD1* 位于第八染色体的一个 PAC 克隆 (P0672D01) 上。

为确定 *OsLSD1* 的拷贝数, 水稻品种 CO39, C101A51, Nipponbare, IR24 和 IR36 的基因组 DNA 分别用 *Bam*H I, *Eco*R I 和 *Hind* III 进行切割. DNA 印迹结果表明 *OsLSD1* 在水稻基因组中是单拷贝, 估计该基因在水稻中普遍存在 (图 1)。

以 *OsLSD1* cDNA 片段 (296 bp) 为探针, 分析了 *OsLSD1* 在水稻 Nipponbare 中的表达模式. 分别提取水稻的根、茎、叶组织的总 RNA 做 RT-PCR 分析. 结果表明 *OsLSD1* 在水稻不同组织中均可表达, 表达量没有明显差异. 这与拟南芥中 *LSD1* (为

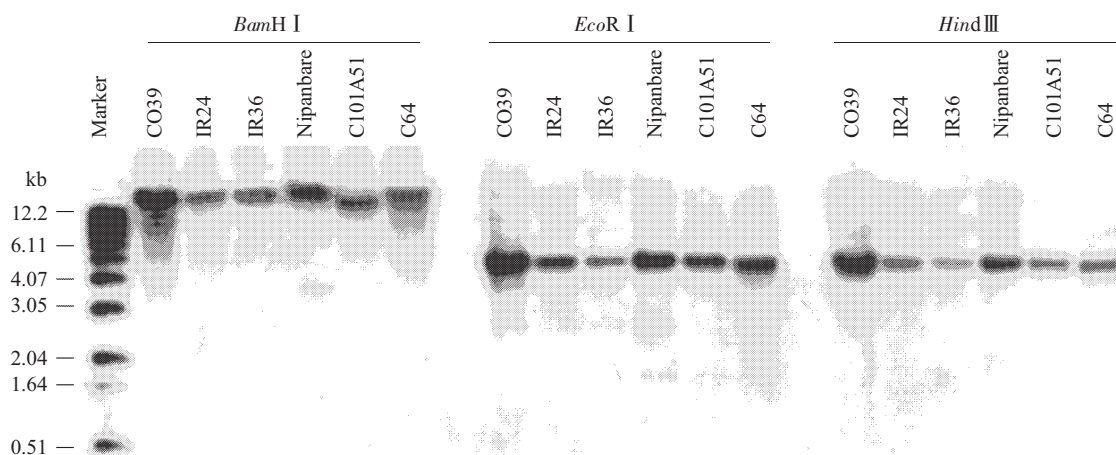


Fig.1 Southern blot analysis of the *OsLSD1* gene

Total genomic DNAs of six rice lines (2 μ g each line) were digested with three restriction enzymes (*Bam*H I, *Eco*R I and *Hind* III) and probed with the 296 bp cDNA fragment. The DNA size marker is 1 kb DNA ladder (GIBCO).

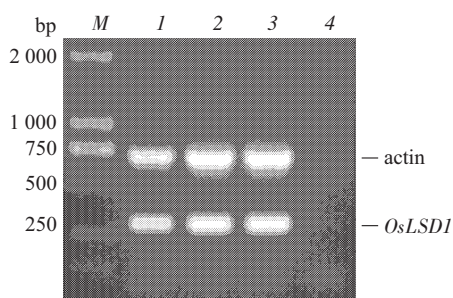


Fig.2 Expression analysis of *OsLSD1* by RT-PCR assay

M: DNA ladder DL 2000; 1: root; 2: stem; 3: leaves; 4: negative control.

Actin primers were used as control amplification.

区别于水稻的类 *LSD1* 基因, 在本文中重命名为 *AtLSD1* 和 *LOL1* (在本文中重命名为 *AtLOL1*) 基因表达模式一致 (图 2).

2.2 拟南芥和水稻类 *LSD1* 基因的序列分析

以 *AtLSD1* 锌指结构域的氨基酸序列查询 TIGR 的拟南芥数据库, 共识别出 5 个拟南芥类 *LSD1* 基因, 这与 Epple 等^[9]的结果一致. 以同样策略搜索水稻的 cDNA 和基因组数据库, 共鉴定出包括 *OsLSD1* 在内的 7 个类 *LSD1* 基因. 这些基因都含有内含子, 数目从 3 到 5 不等 (表 1). 利用 SMART 和 Pfam 数据库, 分析了类 *LSD1* 蛋白的

Table 1 *Arabidopsis* and rice *LSD1*-like genes

Gene name	Accession No.	Amino acid number	Protein domains	Chromosome	Gene structure
<i>AtLSD1</i> ^[3]	At4g20380	189	■ ■ ■	4	□ □ □ □ □
<i>AtLOL1</i> ^[6]	At1g32540	154	■ ■ ■	1	□ □ □ □ □
<i>AtLOL2</i> ^[9]	At4g21610	155	■ ■ ■	4	□ □ □ □ □
<i>AtLSD2</i>	At1g02170	367	■ ■ ■ ■ ■	1	□ □ □ □ □
<i>AtLSD3</i>	At4g25110	418	■ ■ ■ ■ ■	4	□ □ □ □ □
<i>OsLSD1</i>	AY525368	143	■ ■ ■	8	□ □ □ □ □
<i>OsLSD2</i>	J013071E13	186	■ ■ ■ ■ ■	3	□ □ □ □ □
<i>OsLSD3</i>	J023139G05	172	■ ■ ■ ■ ■	12	□ □ □ □ □
<i>OsLSD4</i>	J013104B05	147	■ ■ ■ ■ ■	8	□ □ □ □ □
<i>OsLSD5</i>	NM_192760	163	■ ■ ■ ■ ■	1	□ □ □ □ □
<i>OsLSD6</i>	9638. t03683	378	■ ■ ■ ■ ■	10	□ □ □ □ □
<i>OsLSD7</i>	9631. t02506	369	■ ■ ■ ■ ■	3	□ □ □ □ □

■: zinc finger domain; ■: p20 subunit; □: exon.

功能域. 拟南芥中有 2 个类 LSD1 蛋白(*AtLSD1* 与 *AtLOL1*) 各具有 3 个锌指结构域, 而水稻中有 4 个蛋白 (*OsLSD1*, *OsLSD2*, *OsLSD3* 和 *OsLSD4*) 含有 3 个锌指结构域. 拟南芥和水稻各有 1 个蛋白质 (*AtLOL2* 和 *OsLSD5*) 含有 2 个锌指结构域. 剩余的 4 个蛋白质(*AtLSD2*, *AtLSD3*, *OsLSD6* 和 *OsLSD7*)各含有 1 个锌指结构域和 1 个 metacaspase 的 p20 亚基 (Pfam profile PF00656). p20 亚基在细胞凋亡中起非常关键的作用^[17].

2.3 类 LSD1 蛋白锌指结构域的序列比对分析

对拟南芥和水稻中类 LSD1 蛋白所包含的各锌指结构域进行了多重序列比对, 结果表明, 各 LSD1 锌指结构域同源性较高(图 3), 除锌指结构域以外的其他区域同源性则非常低. 另外, 含有多个类 LSD1 锌指的蛋白质其内部各锌指的同源程度非常高, 这是类 *LSD1* 基因亚家族的一个显著特点, 如 *AtLSD1* 蛋白的 3 个锌指结构域具有共有序列: CxxCRxxLMYxxGASxVxCxxC^[6], 而 *OsLSD1* 蛋白

的共有序列为: CxxCxxLLMYxxGAxSVxCxxC (图 4).



Fig.4 Alignment of the three zinc finger domains of *OsLSD1*
A consensus sequence is listed above.

基于上述对各锌指结构域的序列比对构建了 NJ 进化树, 结果见图 5. 有些锌指结构域是水稻和拟南芥共享的, 这些结构域可能来自于这两个模式植物的共同祖先, 构成直系同源区域, 如 *AtLOL1-3/OsLSD1-3*, *AtLOL1-1/OsLSD1-1* 以及 *AtLOL1-2/OsLSD1-2*. 有些结构域是水稻所特有的, 如 *OsLSD2-1/OsLSD3-1*. 具有 metacaspase p20 亚基的 4 个蛋白质 (*AtLSD2*, *AtLSD3*, *OsLSD6* 和 *OsLSD7*) 在此进化树中被单独聚集在一个分枝上.

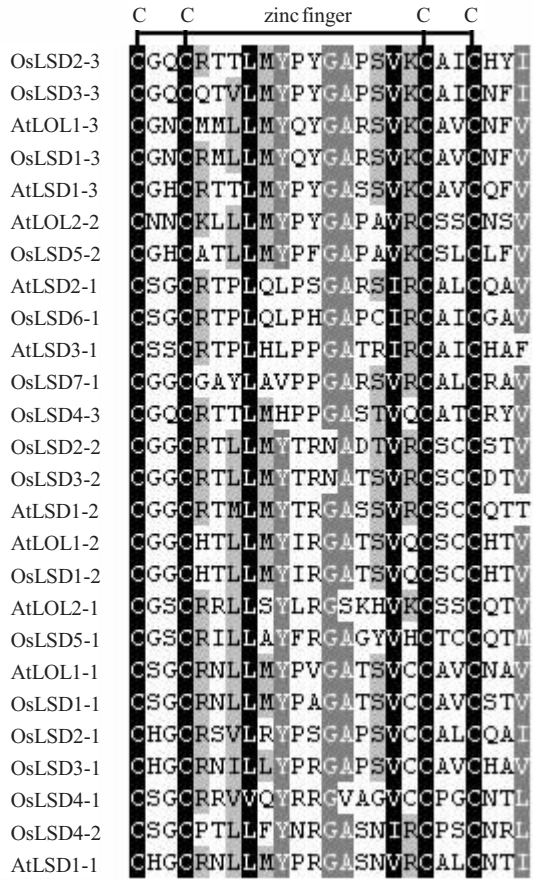


Fig.3 Amino acid alignment of *Arabidopsis* and rice LSD1-like zinc finger domains
The four cysteine residues putatively responsible for the zinc finger structure are indicated. Identical amino acids are highlighted in black.

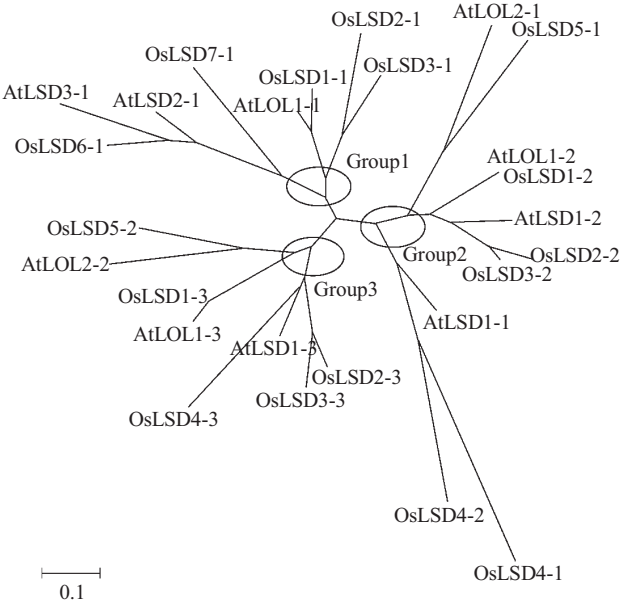


Fig.5 Classification of zinc-finger domains of *Arabidopsis* and rice LSD1-like proteins according to phylogenetic analysis
The scale bar corresponds to 0.1 estimated substitutions per site.

根据类 LSD1 蛋白所具有的各锌指结构域的同源关系, 可以把这些结构域分成 3 个组, 其中组 1 包含 8 个锌指结构域 (*OsLSD7-1*, *AtLSD3-1*, *AtLSD2-1*, *OsLSD6-1*, *AtLOL1-1*, *OsLSD1-1*,

OsLSD2-1 和 OsLSD3-1), 共有序列为: CxxCxxxLxxPxGAXxxxCAxC. 组 2 由 10 个锌指结构域组成 (AtLOL2-1, OsLSD5-1, AtLOL1-2, OsLSD1-2, AtLSD1-2, OsLSD2-2, OsLSD3-2, AtLSD1-1, OsLSD4-1 和 OsLSD4-2), 共有序列: CxxCxxLLxYxRxxxxVxCxxC. 剩余的 8 个锌指结构域构成第 3 组, 共有序列: CxxCxxxLMxxxGAXxVxCxxC.

2.4 类 LSD1 基因家族的系统进化分析

根据蛋白质全长序列, 对拟南芥和水稻的类 LSD1 蛋白进行了系统进化分析, 结果示于图 6. 据此可以把类 LSD1 蛋白分成 2 类. 得到较高 bootstrap 值支持的第一类包括 AtLSD2、AtLSD3、OsLSD6 和 OsLSD7 4 个成员. 在第一类中, 拟南芥或水稻分别拥有 2 个成员, 它们除含有一个锌指结构域以外, 还具有一个与细胞程序化死亡相关的功能域 p20 亚基, 推测它们的功能与细胞凋亡有关. 第二类包括剩余的 8 个类 LSD1 蛋白 (AtLOL1, AtLOL2, AtLSD1, OsLSD1, OsLSD2, OsLSD3, OsLSD4 和 OsLSD5), 其中, AtLOL2 和 OsLSD5 具有 2 个锌指结构域, 其余的都具有 3 个锌指结构域. 从构建出的进化树来看, AtLOL1 和 OsLSD1 是直系同源基因, OsLSD2 和 OsLSD3 是旁系同源基

因, 在拟南芥中只有一个对应的同源基因 AtLSD1. 没有发现拟南芥或水稻特有的类 LSD1 基因, 推测它们是从单、双子叶植物的共同祖先进化而来的.

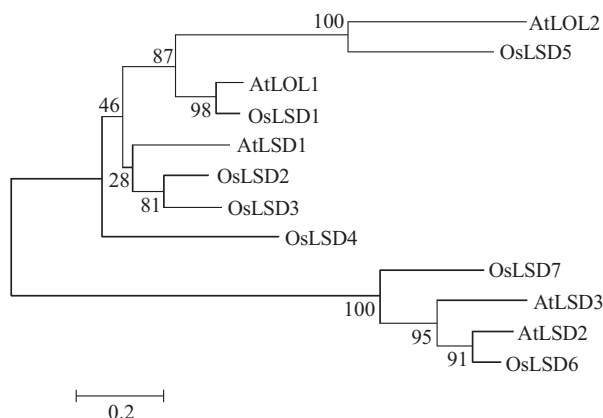


Fig.6 Phylogenetic analysis of LSD1-like proteins from rice and Arabidopsis based on neighbor-joining method

Bootstrap values from 500 replicates are shown. The scale bar corresponds to 0.2 estimated substitutions per site.

值得注意的是, 在各同源基因中, 除了 AtLOL1 和 OsLSD1 的氨基酸序列同源性高达 85% 外, 其余的同源性均较低 (40%~60%). AtLOL1 蛋白的 N 端有一个预测的 N-糖基化位点, C 端有一个潜在的磷酸化位点, 但这两个作用位点在 OsLSD1 蛋白中是没有的 (图 7).



Fig.7 Amino acid sequence alignment of AtLOL1 and OsLSD1

Conserved amino acid residues are shaded. The numbers on right side indicate the amino acid positions of each protein. Gaps were introduced to maximize alignment. Single underline is the predicted N-glycosylation site at the N-terminal of AtLOL1. Double underline is the putative phosphorylation site at the C-terminal of AtLOL1.

我们也对拟南芥和水稻类 LSD1 基因编码区的核苷酸序列进行了系统进化分析, 结果类似于根据氨基酸序列所得到的结果 (图 8). 由于各 DNA 序列间的同源性要低于相应的蛋白质同源度, 所以对应 DNA 序列各分枝的 bootstrap 值要低一些.

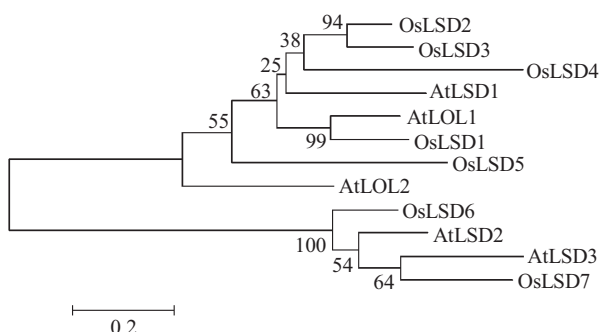


Fig. 8 Phylogenetic analysis of CDS of LSD1-like proteins from rice and Arabidopsis based on neighbor-joining method

Bootstrap values from 500 replicates are shown. The scale bar corresponds to 0.2 estimated substitutions per site.

3 讨 论

3.1 拟南芥和水稻类 *LSD1* 基因的功能

在以上所述的类 *LSD1* 基因家族成员中, 目前只有 2 个基因, 即 *AtLSD1* 和 *AtLOL1*, 被成功克隆并进行了功能分析^[6,9]. 第一个成员 *AtLSD1* 基因是用图位克隆法从拟南芥 *lsd1* 突变体中克隆得到的. 在长日照条件下, *lsd1* 突变体会自发地形成蔓延型类病斑, 逐渐导致整个植株的死亡^[18]. *AtLSD1* 基因的功能是作为植物 PCD 的负调节子, 限制植物对外界刺激的反应以及随后细胞死亡的扩展^[9]. 与 *AtLSD1* 功能相反, 拟南芥 *AtLOL1* 则是植物 PCD 的正调节子. 在拟南芥中过量表达 *AtLOL1* 不仅加速对无毒病原菌的过敏反应 (hypersensitive response, HR), 而且降低了对毒性病菌的敏感性^[9]. *AtLOL2* 可能参与整合超氧化物信号, 维持活性氧中间物的稳态^[9]. 本实验室克隆了水稻 *OsLSD1* 基因, 初步研究结果表明, 该基因是植物 PCD 的负调节子和愈伤分化的正调节子(未发表数据). 另外, 拟南芥和水稻中各有 2 个含有 metacaspase p20 亚基的蛋白质. 哺乳动物中的 metacaspase 对细胞凋亡具有非常重要的作用, p20 亚基能够独立引起细胞凋亡^[17,19], 暗示了该 4 个蛋白质可能参与植物细胞程序化死亡的调节. 总之, 虽然类 *LSD1* 基因家族比较小, 在拟南芥和水稻中分别只有 5 个和 7 个成员, 但该家族对植物 PCD 的调节起着极其重要的作用, 因此, 从基因组水平上识别、分析类 *LSD1* 基因, 从而了解其功能具有十分重要的意义.

3.2 拟南芥和水稻类 *LSD1* 基因家族的比较基因组学分析

对已经释放的拟南芥和水稻 cDNA 和基因组数据库进行搜索, 共识别出 12 个含有类 *LSD1* 锌指结构域的基因. 拟南芥和水稻的这些基因可以分为 2 组, 确定了每个组内的直系同源和旁系同源基因的关系. 直系同源指不同基因组中从共同祖先的同一基因分化形成的基因, 旁系同源是在同一基因组中通过基因复制造成的. 通常旁系同源基因表现出不同的功能, 而直系同源基因很可能具有相似的功能, 尤其是那些承担重要生物学功能的基因^[20]. 界定直系同源和旁系同源基因是比较基因组学的关键. 从拟南芥和水稻类 *LSD1* 蛋白的系统进化关系分析结果可以看出(图 6), *OsLSD1* 和 *AtLOL1* 是直系同源基因, 氨基酸序列同源性高达 85%, 最初推测它们具有类似的功能. 然而我们的研究发现,

OsLSD1 与 *AtLSD1* 基因功能相似, 都是作为细胞程序化死亡的负调节子, 而 *AtLOL1* 是植物 PCD 的正调节子^[9]. *OsLSD1* 和 *AtLOL1* 的这种生物学功能差异可能是翻译后修饰的不同导致的. *AtLOL1* 蛋白比 *OsLSD1* 额外具有一个潜在的糖基化位点和一个磷酸化位点(图 7). 蛋白质的糖基化和磷酸化具有十分重要的生物学意义, 特别是蛋白质的磷酸化和去磷酸化过程是生物体内普遍存在的信号转导调节方式.

在不同物种间比较多基因家族, 有时会发现某一物种中存在几个基因与另一物种的某一基因直系同源, 表明它们很可能来源于近期复制事件. 在本研究中, 具有 1 个和 2 个锌指功能域的拟南芥和水稻类 *LSD1* 蛋白的数目是相等的, 而含有 3 个锌指功能域的水稻类 *LSD1* 蛋白比拟南芥的多了 2 个, 即 3 个水稻基因 (*OsLSD2*, *OsLSD3*, *OsLSD4*) 对应拟南芥的 *AtLSD1* 基因. 这可能是单双子叶分化后基因复制的结果, 推测它们与 *AtLSD1* 具有相似的功能. 虽然上述生物信息学研究结果, 为阐明该家族蛋白质的生物学功能提供了有参考价值的信息, 但是并不能取代实验的验证. 对于是否所有类 *LSD1* 蛋白都参与对植物 PCD 的调控还有待更进一步研究.

参 考 文 献

- 1 Hoeberichts F A, Woltering E J. Multiple mediators of plant programmed cell death: interplay of conserved cell death mechanisms and plant-specific regulators. *BioEssays*, 2003, **25** (1): 47~57
- 2 Laity J H, Lee B M, Wright P E. Zinc finger proteins: new insights into structural and functional diversity. *Curr Opin Struct Biol*, 2001, **11** (1): 39~46
- 3 刘 强, 张贵友, 陈受宜. 植物转录因子的结构与调控作用. *科学通报*, 2000, **45** (14): 1465~1474
Liu Q, Zhang G Y, Chen S Y. *Chin Sci Bull*, 2000, **45** (14): 1465~1474
- 4 The *Arabidopsis* Genome Initiative. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 2000, **408** (6814): 796~815
- 5 Goff S A, Ricke D, Lan T H, et al. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. Japonica). *Science*, 2002, **296** (5565): 92~100
- 6 Dietrich R A, Richberg M H, Schmidt R, et al. A novel zinc finger protein is encoded by the *Arabidopsis LSD1* gene and functions as a negative regulator of plant cell death. *Cell*, 1997, **88** (5): 685~694
- 7 Riechmann J L, Heard J, Martin G, et al. *Arabidopsis* transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science*, 2000, **290** (5499): 2105~2110

- 8 Kliebenstein D J, Dietrich R A, Martin A C, *et al.* LSD1 regulates salicylic acid induction of copper zinc superoxide dismutase in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant-Microbe Interact*, 1999, **12** (11) : 1022~1026
- 9 Epple P, Mack A A, Morris V R F, *et al.* Antagonistic control of oxidative stress- induced cell death in *Arabidopsis* by two related, plant-specific zinc finger proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100** (11) : 6831~6836
- 10 Yu J, Hu S, Wang J, *et al.* A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. Indica). *Science*, 2002, **296** (5565) : 79~92
- 11 Kikuchi S, Satoh K, Nagata T, *et al.* Collection, mapping, and annotation of over 28 000 cDNA clones from japonica rice. *Science*, 2003, **301**(5631):376~379
- 12 He C, Fong S H, Yang D, *et al.* BWMK1, a novel MAP kinase induced by fungal infection and mechanical wounding in rice. *Mol Plant-Microbe Interact*, 1999, **12** (12) : 1064~1073
- 13 Sambrook J, Fritish E F, Manicitis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- 14 Letunic I, Goodstadt L, Dickens N J, *et al.* Recent improvements to the SMART domain-based sequence annotation resource. *Nucleic Acids Res*, 2002, **30** (1) : 242~244
- 15 Bateman A, Birney E, Cerruti L, *et al.* The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res*, 2002, **30** (1) : 276~280
- 16 Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, *et al.* The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res*, 1997, **25** (24) : 4876~4882
- 17 Suarez M F, Filonova L H, Smertenko A, *et al.* Metacaspase-dependent programmed cell death is essential for plant embryogenesis. *Curr Biol*, 2004, **14** (9) : R339~340
- 18 Dietrich R A, Delaney T P, Uknes S J, *et al.* *Arabidopsis* mutants simulating disease resistance response. *Cell*, 1994, **77** (4) : 565~577
- 19 Nguyen M, Breckenridge D G, Ducret A, *et al.* Caspase-resistant BAP31 inhibits fas-mediated apoptotic membrane fragmentation and release of cytochrome c from mitochondria. *Mol Cell Biol*, 2000, **20** (18) : 6731~6740
- 20 Tatusov R L, Koonin E V, Lipman D J. A genomic perspective on protein families. *Science*, 1997, **278** (5338) : 631~637

Cloning of a Novel Rice Gene *OsLSD1* and Bioinformatic Analysis of *LSD1*-like Gene Family From *Arabidopsis* and Rice *

WANG Li-Juan^{1,2}, TIAN Ying-Chuan¹, HE Chao-Zu¹**

⁽¹⁾National Key Laboratory of Plant Genomics, Institute of Microbiology, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China;

⁽²⁾Graduate School of The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

Abstract *LSD1*-like proteins are a family of plant-specific transcription factors that contain a specific class of C2C2 type zinc finger domain. Two members of this family have been identified and proved to control plant programmed cell death (PCD) in *Arabidopsis*. Here, a novel rice *LSD1*-like gene was cloned from a cDNA library and designated as *OsLSD1* (for *Oryza sativa LSD1*). The cDNA is 988 bp in size, containing an open reading frame of 432 bp. The predicted *OsLSD1* protein (143 amino acid residues) contains three internally conserved zinc finger domains. Southern blot indicated that *OsLSD1* is a single-copy gene in rice. Furthermore, the *OsLSD1* gene was expressed constitutively in rice root, stem and leaf. Using Bioinformatic tool, five and seven *LSD1*-like genes were identified from the databases of *Arabidopsis* and rice, respectively. The gene structure and domain organization of these *LSD1*-like genes were determined. Phylogenetic analysis of their coding sequences and predicted amino acid sequences suggested these genes can be classified into two classes, and a gene duplication event was identified. Although there is no specific class of *LSD1*-like gene in *Arabidopsis* or rice, some rice-specific zinc finger domains are found.

Key words *LSD1*-like gene, zinc finger domain, programmed cell death (PCD), phylogenetic analysis, gene duplication

*This work was supported by grants from The Special Funds for Major State Basic Research of China (G2000016203) and The National Natural Sciences Foundation of China (30270706).

**Corresponding author. Tel: 86-10-62642536, E-mail: hecz@sun.im.ac.cn

Received: September 28, 2004 Accepted: October 15, 2004