

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: RSA5280015

ชื่อโครงการ: ลักษณะสมบัติเชิงหน้าที่ของยีนกลุ่ม *OsCML* จากข้าว *Oryza sativa* L.

ชื่อนักวิจัย: รองศาสตราจารย์ ดร. วีรพงษ์ บัวบุชา

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Email Address: Teerapong.B@Chula.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: 3 ปี

คัลมอดูลิน (Calmodulin, CaM) เป็นโปรตีนส่งผ่านสัญญาณแคลเซียมที่ทำงานโดยจับและควบคุมโปรตีนเป้าหมายในการตอบสนองทางสรีรวิทยาต่อสิ่งกระตุ้นที่หลากหลายของพืช ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยได้ศึกษาโปรตีนรีคอมบิแนนท์ที่ทำให้บริสุทธิ์ของยีน *Cam* สามยีนและยีน *Cam-like* (*CML*) แปรยีนจากข้าว พบว่าโปรตีนทั้งหมดแสดงสมบัติ electrophoretic mobility shift ในภาวะที่มีแคลเซียม ในตรวจวัดการเปลี่ยนโครงรูปเมื่อจับแคลเซียมโดยวิธี CD spectroscopy และ fluorescence spectroscopy ของ ANS พบว่าโปรตีน *OsCML* แสดงลักษณะในเชิงโครงสร้างและหน้าที่ที่มีความหลากหลายทั้งในลักษณะที่เหมือนและที่แตกต่างจาก CaM การศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีน *OsCML* แก่ยีนโดยวิธี real-time PCR ในข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 พบว่าภายใต้ภาวะความเครียดจากความเค็ม (150 mM NaCl) และความเครียดออกซิเดติก (20% PEG) การแสดงออกของยีน *OsCML4* และ *OsCML8* มีระดับสูงขึ้นอย่างชัดเจนตั้งแต่ 3 ชั่วโมงจนถึงอย่างน้อย 24 ชั่วโมงหลังจากได้รับความเครียด ขณะที่การแสดงออกของยีน *OsCML5* และ *OsCML11* ถูกกระตุ้นอย่างรวดเร็วที่ 1 และ 3 ชั่วโมงตามลำดับภายหลังจากได้รับความเครียดทั้งสองชนิด นอกจากนี้ยังพบการแสดงออกของยีน *OsCML1* เพิ่มขึ้นที่ 1 ชั่วโมงหลังได้รับความเครียดจากความเค็มแต่ไม่เพิ่มขึ้นเมื่อได้รับความเครียดออกซิเดติก ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าผลิตภัณฑ์ของยีนเหล่านี้จะมีหน้าที่สำคัญในการตอบสนองที่อาศัยแคลเซียมต่อความเครียดดังกล่าว นอกจากนี้ผู้วิจัยยังได้ค้นหา binding-protein ของ *OsCaM1*, *OsCML3* และ *OsCML3d* โดยวิธี cDNA expression library screening พบโคลน cDNA ที่แตกต่างกันสำหรับโปรตีน *OsCaM1* และ *OsCML3d* อย่างละเก้าชนิด และสำหรับโปรตีน *OsCML3* อีกสองชนิด โดยพบว่ายีนเหล่านี้สร้างโปรตีนซึ่งเป็น CaM-binding protein ที่รู้จักมาก่อนสี่ชนิดคือ cyclic nucleotide-gated ion channel, glutamate decarboxylase, CaM-binding transcription activator และ kinesin motor domain-containing protein และยังพบ CaM/CML-binding protein ชนิดใหม่ซึ่งยังไม่เคยมีการค้นพบมาก่อนอีก 13 ชนิด จากผลการทดลองทั้งหมดแสดงให้เห็นว่า genetic polymorphism ช่วยส่งเสริมการเกิดความหลากหลายในหน้าที่ของกลุ่มโปรตีน *OsCML* ซึ่งมีสมาชิกที่น่าจะมีกลไกการทำงานที่ทั้งเหมือนและแตกต่างจากโปรตีน *OsCaM* ข้อมูลทั้งหมดเหล่านี้จะช่วยให้ทำให้การศึกษาหน้าที่ในระดับโมเลกุลและความสำคัญในเชิงสรีรวิทยาของโปรตีน *OsCML* ในการส่งผ่านสัญญาณควบคุมการตอบสนองต่อความเครียดจากสิ่งแวดล้อมและควบคุมความทนต่อความเครียดจากสิ่งแวดล้อมที่หลากหลายในข้าวได้ดียิ่งขึ้น

คำสำคัญ: สัญญาณแคลเซียม คัลมอดูลิน ข้าว

Abstract

Project Code: RSA5280015
Project Title: Functional characterization of *OsCML* genes from *Oryza sativa* L.
Investigator: Teerapong Buaboocha, Ph.D.
 Department of Biochemistry, Faculty of Science
 Chulalongkorn University
Email Address: Teerapong.B@Chula.ac.th
Project Period: 3 years

Calmodulin (CaM) transduces the increase in cytosolic Ca^{2+} concentrations by binding to and altering the activities of target proteins, and thereby affecting the physiological responses to the vast array of stimuli. Here, we examined the purified recombinant proteins encoded by three *Cam* and eight *Cam-like* (CML) genes from rice. All recombinant proteins exhibited an electrophoretic mobility shift when incubated with Ca^{2+} . By examining their conformational changes upon Ca^{2+} -binding by CD spectroscopy and fluorescence spectroscopy using ANS, OsCMLs were found exhibiting a spectrum of both structural and functional characteristics that ranged from typical to atypical of CaMs. Expression patterns of nine *OsCML* genes were examined by real-time PCR in rice *Oryza sativa* L. cv. *KDML105*. Under salt stress (150 mM) and osmotic stress (20% PEG), expression of *OsCML4* and *OsCML8* was significantly increased after 3 hours until at least 24 hours after treatment. On the other hand, expression of *OsCML5* and *OsCML11* was up-regulated as early as 1 hour and 3 hours after both stresses, respectively, before rapidly returning to their normal levels. In addition, expression of *OsCML1* was shown to increase only at 1 hour after salt stress, but not after osmotic stress. These results suggest that products of these genes may function in Ca^{2+} -mediated response to these stresses. Finally, binding proteins of OsCaM1, OsCML3 and OsCML3d were identified by cDNA expression library screening. Nine distinct positive cDNA clones were each obtained from OsCaM1 and OsCML3d, and two from OsCML3. Altogether, the screening identified four previously known CaM-binding proteins from other plants including a cyclic nucleotide-gated ion channel, a glutamate decarboxylase, a CaM-binding transcription activator, and a kinesin motor domain-containing protein. However, 13 putative novel CaM/CML-binding proteins, whose functions are involved in diverse cellular processes, were revealed. Taken together, these results suggest that genetic polymorphism has promoted the functional diversity of the *OsCML* family, whose members possess modes of actions probably different from, though maybe overlapping with, those of *OsCaMs*. These data will help facilitate further investigations into molecular functions and physiological significance of *OsCML* proteins in mediating stress response and tolerance to diverse environmental stresses of rice plants.

Keywords: calcium signaling; calmodulin; CaM; CML; rice