

水稻谷蛋白基因 *GluB 6* 的 cDNA 克隆及表达

牛洪斌¹ 王益华¹ 翟虎渠² 万建民^{1,2,*}

(¹ 南京农业大学 作物遗传与种质创新国家重点实验室, 江苏 南京 210095; ² 中国农业科学院 作物科学研究所, 北京 100081; * 通讯联系人, E-mail: wanjm@caas.net.cn)

cDNA Cloning and Expression Analysis of *GluB 6* in Rice

NIU Hong bin¹, WANG Yi hua¹, ZHAI Hu qu², WAN Jian min^{1,2,*}

(¹ State Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement/Research Center of Jiangsu Plant Gene Engineering, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; ² Crop Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China;

* Corresponding author, E-mail: wanjm@caas.net.cn)

Abstract: Based on the conserved amino acid sequences of rice glutelin gene family, one highly homologous BAC clone sequence from the rice genome database of GenBank was obtained and a putative glutelin gene was predicted. After amplified by RT-PCR with the specific primers designed on the basis of predicted nucleotide sequence, a new glutelin gene cDNA, named *GluB 6* (GenBank accession number is AY429651), was cloned. DNA sequencing analysis and in vitro expression results showed that the cloned cDNA was 1517 bp, and carried entire coding sequences, which encoded a 495 amino acid protein; this corresponded to the size of the glutelin protein family. Homology analysis showed that the deduced amino acid sequence of *GluB 6* shared 53.6% - 82.8% identity with rice glutelin gene family other else. Northern blot analysis indicated that *GluB 6* expressed especially in rice endosperm.

Key words: rice; glutelin gene; cloning; expression

摘要: 根据已克隆谷蛋白基因的保守氨基酸序列搜索基因组数据库, 获得与之高度同源的水稻基因组序列, 通过生物软件进行基因预测和验证, 用 RT-PCR 法克隆得到 1 个新的谷蛋白基因的 cDNA 克隆。核酸序列分析和体外表达结果表明, 该基因 cDNA 序列全长为 1517 bp, 含有 1 个编码 495 个氨基酸残基的开放阅读框 (ORF), 推导的氨基酸序列与谷蛋白基因家族的相似性介于 53.6% ~ 82.8%, 并与 B 亚族谷蛋白基因的同源性更高, 因此命名为 *GluB 6* (GenBank 注册号 AY429651)。Northern 杂交显示, *GluB 6* 基因具有高度的胚乳表达特性。

关键词: 水稻; 谷蛋白基因; 克隆; 表达

中图分类号: Q943.2; S511.03

文献标识码: A

文章编号: 1001-7216(2007)02-0111-06

谷物种子贮藏蛋白主要存在于胚乳中, 按其溶解性的差异可分为球蛋白、清蛋白、谷蛋白和醇溶蛋白^[1]。与小麦、玉米和大麦等谷物以醇溶蛋白为主不同, 水稻种子贮藏蛋白主要以谷蛋白的形式存在, 约占胚乳总蛋白的 60% ~ 80%, 醇溶蛋白次之, 含量为 5% ~ 10%^[2,3]。研究证实, 谷蛋白以蛋白体 (protein body, PB) 的形式贮存于胚乳中。Tanaka 等^[4]从水稻成熟胚乳中分离出两种蛋白体: 蛋白体 (PB₁) 和蛋白体 (PB₂), 其中 PB₁ 由分子量为 10、13、16 和 57 kD 的多肽构成, 而 PB₂ 含有分子量为 22、26、37、38 和 39 kD 等多肽组分。分步分离证实, PB₂ 主要以醇溶蛋白为主, 并含有微量的球蛋白。相比之下, PB₁ 由不同分子量的成熟谷蛋白构成, 并可分为 22 kD 和 37 ~ 39 kD 两种类型^[5]。然而, 水稻体内并不存在直接编码 22 kD 和 37 ~ 39 kD 多肽的转录本, 这是由于谷蛋白基因的原始翻译产物是一类氨基酸残基, 数目在 496 ~

499, 分子量约为 57 kD 的前体^[6]。新合成的谷蛋白前体经过穿膜、剪切和酶解等一系列目前还不甚清楚的复杂过程最终形成成熟谷蛋白^[7,8]。

研究表明, 水稻谷蛋白基因属于多基因家族。自从 1986 年首次克隆到一个谷蛋白基因以来, 目前至少已克隆到 9 个谷蛋白基因或 cDNA^[9-18], 其中包含两个假基因 *GluA 4* 和 *GluB 3*^[13]。根据这些基因序列的相似性可将其分为 *GluA* 和 *GluB* 两个亚家族, 亚族内基因间碱基相似性达到 80% 以上, 亚族间同源性在 60% 左右^[11,16,19], 每个亚族各含有 5 ~ 8 个基因拷贝。关于谷蛋白的生物合成途径

收稿日期: 2005-07-06; 修改稿收到日期: 2006-01-23。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30170570); 中国水稻发展基金资助项目 (0003102); 国家 863 计划转基因专项资助项目 (JY03-A-07-02)。

第一作者简介: 牛洪斌 (1970 -), 博士研究生, E-mail: newhobby@163.com。

的具体过程还不清楚,众多未知谷蛋白基因的存在更增加了上述研究的难度,因此尽可能地克隆到所有的谷蛋白结构基因将是解决上述难题的有效途径之一。本研究采用生物信息学方法,根据已克隆谷蛋白基因的保守序列搜索水稻基因组数据库获得与之高度同源的基因组序列,并通过软件预测和 RT-PCR 的方法克隆得到一个新的 B 亚族谷蛋白基因,并对该基因的结构特点、组织表达特性以及家族内基因成员间的遗传进化关系进行了研究,为谷蛋白基因的深入研究作出了有益的探索。

1 材料与方法

1.1 实验材料

供试水稻材料为粳稻品种日本晴 (*Oryza sativa* L. subsp. *japonica* cv. Nipponbare), 2003 年正季种植于南京农业大学实验农场。分别收取水稻花后 10~15 d 未成熟种子,并立即液氮冻存,保存于 -80 °C 低温冰箱中备用。

以大肠杆菌 DH5 为 cDNA 克隆转化受体菌株,大肠杆菌 DE₃ 为体外表达受体菌株,购自 Promega 公司的 pGEM-T 为克隆载体。RNA LA PCR™ Kit、相关的限制性内切酶和 T₄ DNA 连接酶购自大连宝生物工程有限公司;PCR 引物由大连宝生物工程有限公司合成。

1.2 水稻胚乳 RNA 的提取及 cDNA 一链的合成

采用冷酚法提取花后 10~15 d 未成熟种子胚乳总 RNA^[20],cDNA 一链的合成参照试剂盒说明。

1.3 谷蛋白基因 *GluB 6* 的 cDNA 克隆

根据已经克隆的 B 亚族谷蛋白基因 *GluB 1*、*GluB 2* 和 *GluB 4* 的保守序列,运行 BLAST 程序搜索 GenBank 水稻基因组数据库,并利用相关软件对所获得的高度同源基因组序列进行基因预测。其中,GenBank 注册号为 AP005511 的 BAC 克隆可能含有一个新的谷蛋白基因。根据预测的核酸序列设计该基因特异性 PCR 扩增引物:5'-GCTATGACTATTTCCGTTTTCTCTG-3' 和 5'-TTTCCTAATA TTAGATCTTAGTTACAT-3'。PCR 扩增反应条件为 94 °C 下预变性 3 min,94 °C 下变性 40 s,56 °C 下退火 40 s,72 °C 下延伸 2 min,共 35 个循环,最后在 72 °C 下延伸 10 min,预计扩增产物长度为 1517 bp。

PCR 扩增产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳分离后,切取、回收目的片段,并与 pGEM-T 载体连接过夜。利用热激法将连接产物转化进入大肠杆菌 DH5,采用蓝白斑对阳性克隆进行初步筛选。挑

取白色抗性菌落,少量培养后用碱裂解法提取质粒 DNA。

1.4 DNA 序列分析

采用 ABI3730XL DNA Analyzer 对克隆在 pGEM-T 载体中的特异 cDNA 片段进行双向重复测序。利用 DNASTAR 软件对测序结果与已知水稻谷蛋白基因家族成员进行序列比对分析,并用 Bootstrap 方法对构建的系统发生树进行评估,同时利用 Nj plot 和 Treeview 软件对系统发生树进行处理。

1.5 *GluB 6* 的体外表达分析

根据测序结果合成 5' 端分别含有 *Bam*H 和 *Hind* 的特异性引物,引物序列为:5'-CGCGGATCCATGACTATTTCCGTTTTCTCT-3',5'-CGCAAGCTTCTAATATTAGATCTTAGTTACA-3'。以 *GluB 6* cDNA 为模板,利用上述引物进行 PCR 扩增,经过 *Bam*H 和 *Hind* 双酶切、回收之后装入 pET-30a⁺ 表达载体,并转化进入 DE₃ 菌株。在 50 mL 含有 kan 抗生素的 LB 培养基中 28 °C 下培养上述菌株至 OD₆₀₀ 达到 0.5 时,加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L,25 °C 下继续培养 5 h;取 5 mL 上述菌液,5000 r/min 下离心 5 min,收集菌体并重悬于裂解缓冲液中 (20 mmol/L Tris HCl pH 7.9,含 0.02% Tween 20) 经 30 min 沸水浴,离心,分别收取上清和沉淀,加入适量的裂解缓冲液和等体积的 2× SDS 加样缓冲液,进行 SDS PAGE 分析。

1.6 *GluB 6* 的组织表达分析

采用 Northern 杂交检测 *GluB 6* 的组织表达特性。冷酚法提取花后 10~15 d 水稻的根、茎、叶和未成熟胚乳总 RNA,电泳检测,并利用 DU8000 型分光光度计测定浓度。每个样品取 20 μg 总 RNA,65 °C 下变性 10 min,经琼脂糖/甲醛凝胶电泳分离后毛细管法转移至带正电的尼龙膜上。为避免杂交结果在不同谷蛋白基因间出现“串话”现象,利用 PCR 扩增 *GluB 6* 3' 端特异性基因片段作为杂交探针,扩增用引物对序列为:5'-CGCTAATGCCTTCG TGAGCCAG-3',5'-ACTCTGAAGTCTCGCCTTT AGATTG-3'。以 ³²P dCTP 为标记,采用寡聚核苷酸延伸法合成放射性探针,并进行杂交,所用探针总量为 50 ng;杂交条件为 42 °C 下预杂交 3 h,杂交 16 h,杂交后在 45 °C 下用 2× SSPE/0.5% SDS 溶液洗膜 30 min,并重复 3 次;55 °C 下以 0.1× SSPE/0.5% SDS 溶液洗膜 15 min,重复 3 次,待膜稍微干燥之后压入磷屏仪曝光 5~8 h,并对杂交结果进行

扫描分析。

2 结果与分析

2.1 水稻 *GluB 6* 的 cDNA 克隆与序列分析

根据谷蛋白 B 亚族基因保守序列搜索水稻基因组数据库,利用软件对所获得的高度同源基因组序列进行预测,并根据预测结果设计引物,经 RT-PCR 扩增、电泳得到 1 个长度约为 1.5 kb 的特异片段(图 1)。序列测定结果表明,该 cDNA 片段长度为 1517 bp,与预期长度完全符合。氨基酸序列推导发现,该基因含有 1 个由 495 个氨基酸残基组成的读码框(图 2),分子量约为 57 kD,与谷蛋白分子量相符。利用 DNASTAR 将该 cDNA 序列与原始基因组数据比较发现(数据未公布),新克隆基因包含 4 个外显子,与典型的谷蛋白基因十分相似,并且在同一编码阅读框的起始密码子上游 66 bp 处存在一个终止密码子,而且在上述推导的终止密码子和起始密码子之间不存在甲硫氨酸。由于真核生物来源基因一般都是从第 1 个甲硫氨酸进行翻译,据此推断该 cDNA 已经包含起始密码子在内的编码信息;序列分析显示在该 cDNA 序列下游 1489 bp 处也存在 1 个翻译终止密码子 TAA,表明已获得 3 端完整信息。因此初步认为已获得该 cDNA 片段完整的编码序列,并命名为 *GluB 6*(GenBank 注册号为 AY429651)。

2.2 谷蛋白基因家族氨基酸序列比较

利用 DNASTAR 软件对包括 *GluB 6* 在内的谷蛋白基因家族进行氨基酸序列比对和聚类分析。结果表明(表 1、图 2),谷蛋白基因家族氨基酸序列具有较高程度的相似性,总体上处于 57.8% ~ 95.4%,并存在多个高度保守的区段。但是,不同基因间的相似性存在着差异,如 *GluB 6* 与 *GluA 1* 和

GluA 2 间的相似性只有 57.8%,而 *GluA 1* 与 *GluA 2* 间却高达 95.4%。系统发生树结果显示(图 3),谷蛋白基因家族可以被明显地聚类为 A、B 两个亚族,两者分别包含 3 个和 5 个家族成员。亚族内序列的一致性明显高于亚族间,A 亚族和 B 亚族内基因氨基酸序列的相似性分别处于 81.9% ~ 95.4% 和 69.5% ~ 91.5% 水平,而 A、B 亚族间只有 57.8% ~ 64.7%。

统计分析结果还表明,*GluB 6* 与该基因家族其他成员的相似性处于 53.6% ~ 82.8%,并与 B 亚族谷蛋白基因具有更高的相似性,介于 69.5% ~ 82.8%,这与谷蛋白家族的总体趋势相类似。系统发生树同样显示,*GluB 6* 与 B 亚族谷蛋白基因在进化关系上更为密切,属于典型的 B 亚族谷蛋白基因。

2.3 *GluB 6* 体外表达和组织表达分析

GluB 6 基因编码区经亚克隆到原核表达载体 pET30a⁺,并转化到大肠杆菌 DE₃ 进行体外表达。表达产物经 SDS-PAGE 电泳分析,结果(图 4)显

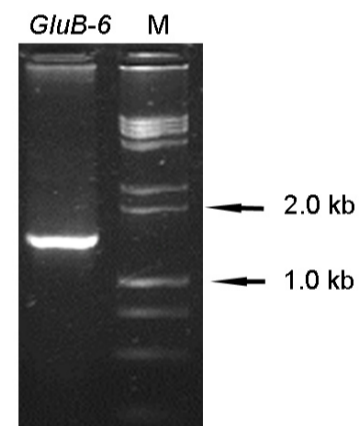


图 1 水稻谷蛋白基因 *GluB 6* 的 RT-PCR 扩增图

Fig. 1. RT-PCR amplification of rice glutelin *GluB 6* cDNA.

M - DNA 分子量标准; *GluB 6* - *GluB 6* cDNA 扩增产物。

M, Wide range DNA ladder marker; *GluB 6*, *GluB 6* RT-PCR product.

表 1 谷蛋白基因氨基酸序列相似性比较

Table 1. Comparison of amino acid sequences of rice glutelin family.

谷蛋白基因 Glutelin gene	<i>GluA 3</i>	<i>GluA 1</i>	<i>GluA 2</i>	<i>GluB 6</i>	<i>GluB 2</i>	<i>GluB 1</i>	<i>GluB 4</i>	<i>GluB 5</i>
<i>GluA 3</i>		82.3	81.9	59.8	63.3	63.9	64.7	58.3
<i>GluA 1</i>	19.1		95.4	57.8	61.1	61.7	63.5	58.5
<i>GluA 2</i>	19.6	4.8		57.8	61.1	61.9	62.7	58.1
<i>GluB 6</i>	53.6	56.3	55.9		82.8	82.0	77.0	69.5
<i>GluB 2</i>	47.2	48.6	48.6	19.8		91.5	83.2	71.1
<i>GluB 1</i>	46.3	48.4	48.0	20.6	9.0		82.3	71.8
<i>GluB 4</i>	45.6	44.8	46.2	26.7	18.2	19.8		75.6
<i>GluB 5</i>	54.6	54.4	55.6	38.2	32.1	33.9	26.5	

注:上三角为相似性百分比,下三角为差异性百分比。

Note: Top triangle for likeness percentage, bottom triangle for difference percentage.

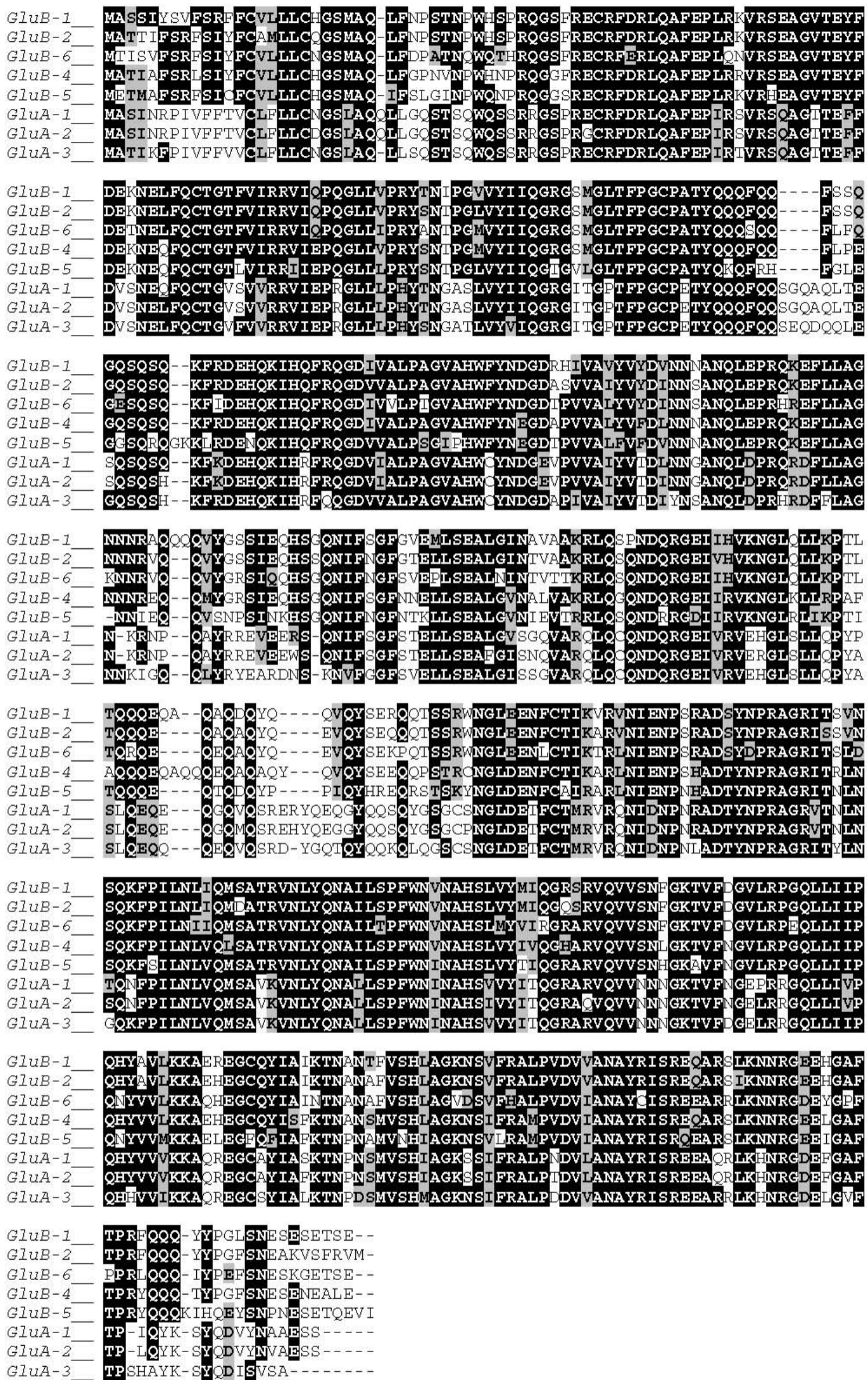


图 2 谷蛋白基因家族成员氨基酸序列的相似性比较

Fig. 2. Alignment of deduced amino acid sequences of *GluB 6* and other rice glutelin genes.

基因注册号分别为：*GluB 1*(AY427569)，*GluB 2*(AY427570)，*GluB 4*(AY427571)，*GluB 5*(AY196923)，*GluB 6*(AY429651)，*GluA 1*(L26819)，*GluA 2*(M21856)和 *GluA 3*(X54313)。

GenBank accession numbers of these cDNAs are *GluB 1*(AY427569)，*GluB 2*(AY427570)，*GluB 4*(AY427571)，*GluB 5*(AY196923)，*GluB 6*(AY429651)，*GluA 1*(L26819)，*GluA 2*(M21856) and *GluA 3*(X54313) .

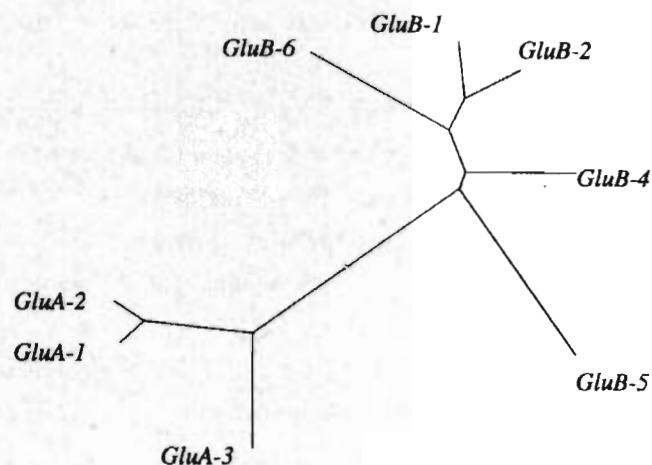


图3 水稻谷蛋白基因家族的系统发生树

Fig. 3. Phylogenetic dendrogram of the deduced amino acid sequences of *GluB-6* protein and other rice glutelins.

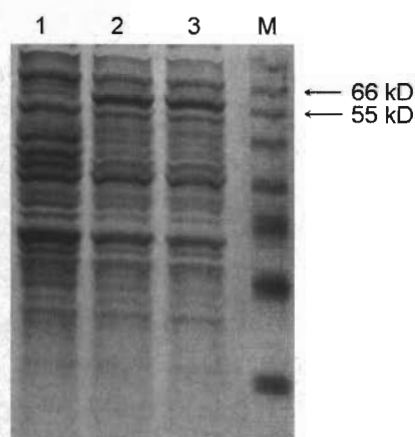
图4 *GluB-6* 基因表达产物的 SDS-PAGE 电泳结果

Fig. 4. Expression of *GluB-6* gene recombinant in pET30a⁺ vector on SDS-PAGE gel.

1—含有空载体 pET30a⁺ 的对照菌株；2—0.5 mmol/L IPTG 诱导的重组菌株；3—1.0 mmol/L IPTG 诱导的重组菌株。

1, pET30a⁺ without insertion; 2, Recombinants induced by 0.5 mmol/L IPTG; 3, Recombinants induced by 1.0 mmol/L IPTG.

示,在蛋白质分子量标记为 55 kD 和 66 kD 之间可明显地观察到重组蛋白的特异条带,并且与预期的分子量相符,而在对照空载体泳道中没有发现相应的特异条带,这说明所推导的氨基酸编码框完全正确。

以 *GluB-6* 基因的 3' 端特异性片段为探针,对不同组织来源的总 RNA 进行 Northern 杂交分析。结果显示(图 5)在花后 10~15 d 的水稻未成熟胚乳中检测到 *GluB-6* 基因的强烈表达,而在根、茎和叶中未发现相应的转录本,表明谷蛋白基因 *GluB-6* 具有高度的胚乳表达特性。

3 讨论

谷蛋白属于多基因家族,现有研究结果表明在

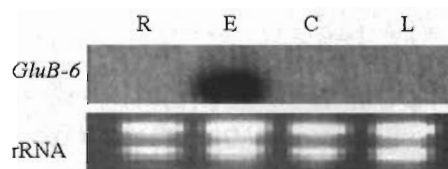
图5 *GluB-6* 组织表达谱

Fig. 5. Expression pattern of *GluB-6*.

R—根；E—未成熟胚乳；C—茎；L—叶。

R, Roots; E, Endosperm; S, Culms; L, Leaves.

水稻中至少含有 10~16 个拷贝。随着 PCR 技术的日见成熟以及水稻全基因组测序的完成,通过生物信息学与 PCR 技术有效结合克隆未知基因变得越来越容易, *GluB-6* 基因的克隆就是一个成功的例子。此外,利用上述方法本实验室还成功地克隆到多个谷蛋白家族成员(另文发表),显示出生物信息学在基因克隆中的强大优势,这无疑将大大加快谷蛋白的研究进程。氨基酸水平比较发现,包括 *GluB-6* 基因在内的 A、B 亚族内成员间相似性存在较大差异,其中 A 亚族成员间的相似性普遍比 B 亚族的要高,这可能是由于谷蛋白起源于不同的进化途径造成的。同时,还应该清醒地认识到,目前所克隆的 A、B 亚族成员数目不同,两者分别为 4 个(包括 1 个假基因)和 6 个(包括 1 个假基因),由于家族成员数目上的差异导致统计分析结果出现偏差的可能性也是存在的。

在生物体内,蛋白质的生物合成是一个系统工程,存在多种水平的调控,而多基因家族的特点更加剧了谷蛋白表达调控的复杂性。研究表明,谷蛋白基因家族成员间转录表达的时期存在着差异。*GluA-3* 基因在种子发育前期开始表达,并于花后 10~16 d 达到峰值;相比之下,其他谷蛋白成员在花后 6 d 才能检测到相应的转录本,并于花后 14~16 d 达到峰值,说明谷蛋白基因的表达受到严格的调控^[21]。本研究也发现 *GluB-6* 基因在花后 10~15 d 强烈表达,至于完整转录表达谱、相关功能验证等研究正在进行中。谷蛋白基因家族的这种次递表达模式的内在机制是什么,都有哪些表达调控因子参与其中值得深入研究^[2,22-23]。此外,谷蛋白和醇溶蛋白基因转录形成的 mRNA 分别定位于内质网上不同的部位^[23-24],转录本的这种分拣机制,及其与不同类型蛋白体形成的关系,也是迫切需要解决的难题^[25-26]。总之,谷蛋白基因的表达调控十分复杂,从基因转录、mRNA 的亚细胞定位到新生肽

链的跨膜运输、信号肽的剪切、类囊体的形成直至成熟谷蛋白形成这一系列过程中都存在严格的调控。通过对谷蛋白合成途径的深入探索,将为彻底阐明蛋白质生物合成途径、基因表达调控特点和代谢机制提供契机。

参考文献:

- [1] Osborne T B . The Vegetable Proteins . 2nd ed . New York : Longmans , Green & Co . , 1924 .
- [2] Yoshihara Y , Washida H , Takaiwa F . Assessment of common regulatory regions required for the endosperm specific expression of rice storage protein glutelin genes by hybrid promoters . *Plant Sci* , 1996 , 121 : 63-73 .
- [3] Katsube T , Kurisaka N , Ogawa M , et al . Accumulation of soybean glycinin and its assembly with the glutelins in rice . *Plant Physiol* , 1999 , 120 : 1063-1073 .
- [4] Tanaka K , Sugimono T , Ogawa M , et al . Isolation and characterization of two type of protein bodies in the rice endosperm . *Agric Biol Chem* , 1980 , 44 : 1633-1639 .
- [5] Tanaka Y , Hayashida S , Hongo M . The relationship of the feces protein particles to rice protein bodies . *Agric Biol Chem* , 1975 , 39 : 515-518 .
- [6] Gallie D R , Bailey J . Eyes off transcription ! The wonderful world of post transcriptional regulation . *Plant Cell* , 1997 , 9 : 667-673 .
- [7] Yamagata H , Sugimoto T , Tanaka K , et al . Biosynthesis of storage proteins in developing rice seeds . *Plant Physiol* , 1982 , 170 : 1094-1100 .
- [8] Wu C Y , Adachi T , Hatano T , et al . Promoters of rice seed storage protein genes direct endosperm specific gene expression in transgenic rice . *Plant Cell Physiol* , 1998 , 39 : 885-889 .
- [9] Masumura T , Kidzu K , Sugiyama Y , et al . Nucleotide sequence of a cDNA encoding a major rice glutelin . *Plant Mol Biol* , 1989 , 12(6) : 723-725 .
- [10] Takaiwa F , Kikuchi S , Oono K . The structure of rice storage protein glutelin precursor deduced from cDNA . *FEBS Lett* , 1986 , 206 : 33-35 .
- [11] Takaiwa F , Ebinuma H , Kikuchi S , et al . Nucleotide sequence of a rice glutelin gene . *FEBS Lett* , 1987 , 221 : 43-47 .
- [12] Takaiwa F , Kikuchi S , Oono K . The complete nucleotide sequence of new type cDNA coding for rice storage protein glutelin . *Nucl Acids Res* , 1989 , 17(8) : 3289 .
- [13] Takaiwa F , Oono K . Genomic DNA sequences of two new genes for new storage protein glutelin in rice . *Jpn J Genet* , 1991 , 66 : 161-171 .
- [14] Takaiwa F , Oono K , Wing D , et al . Sequence of three members and expression of a new major subfamily of glutelin genes from rice . *Plant Mol Biol* , 1991 , 17 : 875-885 .
- [15] Okita T W , Hwang Y S , Hnilo J , et al . Structure and expression of the rice glutelin multigene family . *J Biol Chem* , 1989 , 264(21) : 12563-12581 .
- [16] Okita T W , Krishnan H B , Kim W T . Immunological relationships among the major seed proteins of cereals . *Plant Sci* , 1988 , 57 : 103-111 .
- [17] Higuchi W , Fukazawa C . A rice glutelin and a soybean glycinin have evolved from a common ancestral gene . *Gene* , 1987 , 55 : 245-253 .
- [18] Kusaba M , Miyahara K , Lida S , et al . Low glutenin content 1 : A dominant mutation that suppresses the glutenin multigene family via RNA silencing in rice . *Plant Cell* , 2003 , 15 : 1455-1467 .
- [19] Katsube Tanaka T , Duldulao J B , Kimura Y , et al . The two subfamilies of rice glutelin differ in both primary and higher order structures . *Biochim Biophys Acta* , 2004 , 1699(1/2) : 95-102 .
- [20] 郑霏琴, 王宗阳, 高继平 . 水稻胚乳中核糖核酸的分离 . 植物生理学通讯 , 1993 , 29(6) : 438-440 .
- [21] Zhao Y , Leisy D J , Okita T W . Tissue specific expression and temporal regulation of the rice glutelin *Gt3* gene are conferred by at least two spatially separated *cis*regulatory elements . *Plant Mol Biol* , 1994 , 25(3) : 429-436 .
- [22] Takaiwa F , Yamanouchi U , Yoshihara H , et al . Characterization of common *cis*regulatory elements responsible for the endosperm specific expression of members of the rice glutelin multigene family . *Plant Mol Biol* , 1996 , 30(6) : 1207-1221 .
- [23] Furukawa S , Mizuma T , Kiyokawa Y , et al . Distribution of storage proteins in low glutelin rice seed determined using a fluorescent antibody . *J Biosci Bioeng* , 2003 , 96(5) : 467-473 .
- [24] Li X , Franceschi V R , Okita T W . Segregation of storage protein mRNAs on the rough endoplasmic reticulum membranes of rice endosperm cells . *Cell* , 1993 , 72(6) : 869-879 .
- [25] Yamagata H , Tanaka K . The site of synthesis and accumulation of rice storage proteins . *Plant Cell Physiol* , 1986 , 27 : 135-145 .
- [26] Mochizuki T , Hara S . Usefulness of the low protein rice on the diet therapy in patients with chronic renal failure . *Jpn J Nephrol* , 2000 , 42(1) : 24-29 .