

# 論文の内容の要旨

生産・環境生物学専攻

平成9年度博士課程入学

氏 名 山田 美加

指導教官名 高野 哲夫

論文題目     ダイズアレルゲンタンパク質 *Gly m Bd 30K* 遺伝子の構造と  
                  発現に関する研究

現代人の3人に1人が何らかの物質に対するアレルギーを持っているといわれ、特に食べ物によって引き起こされるアレルギー反応のことを食物アレルギーと呼んでいる。アレルギー患者の血液中にはアレルゲンと結合するIgE抗体が多く含まれている傾向が認められており、アレルゲン物質が体内に侵入すると呼吸困難などを引き起こす原因となる。従って食物アレルギー患者にとって食品素材中のアレルゲンの分布や食品素材間の免疫交差性に関する情報が求められ、様々なアレルゲンが単離されるようになった。

ダイズは日本の伝統的加工食品の素材であり重要なタンパク質源であるとともに、卵、牛乳、肉のようなアレルゲン食品の一つとして知られている。その中でも約65%以上の患者の血清が認識するタンパク質が主要なアレルゲンタンパク質であると同定され、小川らによって *Gly m Bd 30K* と命名されている。 *Gly m Bd 30K* は細胞内では液胞に局在し、oil-body と親和性を持つ。パピンスーパーファミリーに属するチオールプロテアーゼの一種であり（ただし活性は持たない）、同じファミリーに属するダニアレルゲンタンパク質（DerI）と30%の相同性が認められている。このように他のアレルゲンタンパク質と相同性が認められる例は珍しいことではなく、由来する植物が分類学的に近くない場合において

も、アレルゲン分子の免疫交差性が認められている。一方でこれら免疫交差性アレルゲンが実は植物の制御に関与しているタンパク質群であることが報告されるようになり植物由来アレルゲン間にある共通点として注目されている。実際、*Gly m Bd 30K*タンパク質はダイズの病原菌感染時において、病原菌から発せられるエリシター (syringolide) に対して結合する性質を持つことが報告されている。しかし *Gly m Bd 30K* は PR (pathogenesis related) タンパク質ではないことから、耐病性機能において二次的な働きを持つと考えられている。

### 1. *Gly m Bd 30K* 遺伝子の構造解析

*Gly m Bd 30K* の cDNA をプローブとして、ダイズ・ゲノミックライブラリーのスクリーニングを行い、12個のポジティブなクローンが得られた。2つのクローン B7 と B9 についてシーケンス解析を行い、クローン B7 では 6328bp、クローン B9 では 4997bp の塩基配列を決定した。cDNA の塩基配列との比較から、B7、B9 は同じ位置に3つのイントロンを持ち、プロモーター領域として B7 は 4646bp、B9 は 3420bp の塩基配列を含んでいた。クローン B7 のタンパク質コード領域は *Gly m Bd 30K* の cDNA と 99% 相同性があることから functional 遺伝子であると考えられた。それに対してクローン B9 のタンパク質コード領域の塩基配列は B7 と約 90% の相同性を持つが、多くの終始コドンが含まれていたことから偽遺伝子であることを確認した。この結果はゲノムサザンハイブリダイゼーションによって予想されるコピー数と一致していた。また *Gly m Bd 30K* の転写開始点は ATG よりも 40塩基上流にあることが 5'-RACE 法により確認できた。

### 2. *Gly m Bd 30K* プロモーター領域の解析

B7 と B9 のプロモーター領域の塩基配列を比較すると約 60% の相同性があることから、共通の調節機能の存在が推察された。ノーザンハイブリダイゼーションにより *Gly m Bd 30K* の器官特異性について解析した結果、*Gly m Bd 30K* は種子において特異的に発現する性質を持つことが確認された。プロモーター領域の塩基配列を詳細に解析すると、B7 のプロモーター領域には種子特異的発現に関わると報告されているエレメントが数多く含まれることが判明した。*Gly m Bd 30K* のプロモーター機能についてさらに詳細に検討するために、B7 の ATG より上流約 1500塩基のプロモーター領域を GUS レポーター遺伝子と連結してシロイヌナズナに形質転換し、異なる器官における *Gly m Bd 30K* プロモーターの発現制御機

能について解析した。GUS遺伝子はダイズと同様登熟種子に最も強く発現しており、登熟が進むに従って発現は少なくなった。しかし、発芽種子でもGUSの発現は明らかに観察され、発芽の進行とともに消失した。栄養成長期、花芽形成期ではどの器官においてもGUS発現は検出されなかった。

### 3. *Gly m Bd 30K*遺伝子のエリシター応答性

*Gly m Bd 30K*がsyringolide結合性を示すことから、ダイズの耐病性機構において何らかの働きを持つと考えられたので、病原菌感染時に植物体内で誘導、発現されるといわれる植物ホルモン等を処理し、ダイズの葉、タバコ懸濁培養細胞における発現、応答性について検討を行った。ダイズの葉をsyringolide、サリチル酸、アブシジン酸、ジャスモン酸で6、12時間処理し、RT-PCR法によりmRNAの発現量の検出を行った。。水処理区では品種：Halosoy(抵抗性Rpg4/Rpg4)では発現が弱く、品種：Merit(罹病性rpg4/rpg4)では処理後6時間において強い発現が得られた。Syringolide処理区では、処理後24時間でHalosoyとMeritで共に発現量が増加しており、またMeritの方がより早く増加していることが確認できた。サリチル酸処理区では、処理後24時間において両品種で同じ増加傾向を示した。アブシジン酸処理区では両品種で共に発現は認められるものの、処理による増加はみられなかった (Fig.)。ジャスモン酸処理区ではHalosoyでは発現量に変化はなかったが、Meritにおいてやや増加傾向を示した。以上のことから、*Gly m Bd 30K*の葉における発現はsyringolideとサリチル酸に応答性を示した。また、品種間差があることが確認できた。

長さの異なるプロモーター領域をGUS遺伝子に連結しパーティクルガンでタバコ懸濁培養細胞に導入した後に、syringolide、サリチル酸、アブシジン酸、ジャスモン酸で処理し、一過的に誘導されるGUS活性について比較した。その結果、最も短い500塩基のプロモーターにおいてもGUS活性が誘導されており、この部分にプロモーター活性を持つ部位があることがわかった。また偽遺伝子の1500塩基のプロモーターにおいてもGUS活性が観察されるのでB9もかつて機能を持っていたことが推察された。また最も長い領域と、500塩基のプロモーター領域では、GUS誘導に大きな差がないことから、耐病性のシグナル伝達において、感染直後にすばやい応答性を示し、その後の抵抗性誘導を促しているのではないかと考えられた。

*Gly m Bd 30K*プロモーター領域ATGより上流1500塩基を導入した形質転換体シロイヌナズナの葉を用いてsyringolide、サリチル酸、アブシジン酸、ジャスモン酸処理した結果、個

体間差はあるもののGUS活性がそれぞれの区で誘導されていることが確認できた。

#### 4.ダイズおよびアズキの形質転換

ダイズの形質転換を目的とし、発芽種子を用いてアグロバクテリウム・インジェクション法を行った。導入したプラスミドの特異的領域をPCRで確認はできたものの、バンドが検出できた個体の後代では安定したGUS発現が見られなかったことから、幼根と幼芽の間にある未分化組織へのアグロバクテリウム感染には、キメラ個体が生じる率が高いと考えられた。

ダイズの未熟子葉由来の体細胞胚にパーティクルガン処理し形質転換する方法においては2つのプラスミドを用いてのコトランスフォーメーションを行い、PCRの結果から、カナマイシン、*Gly m Bd 30K*コード領域を含むpBI121はバンドとして確認できなかったが、ハイグロマイシンコード領域を含むpCHはバンドとして確認できた。しかし得られた再分化個体において選抜過程でのエスケープ率が高いことが、今後の選抜において課題として残った。

アズキの胚軸にアグロバクテリウム感染させることにより、形質転換を試みた結果、高いシュート形成率は得られたものの、発根培地上で発根できた個体数は少なかった。

これら形質転換法を取り入れ、アレルゲンタンパク質を遺伝学的に低減化せさせることは可能であると考えられるが、発現を抑制させるためのジーンサイレンシングにはメカニズムについて不明な点が多く残されており、今後さらなる改良が必要であると思われた。