

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 山 田 美 加

ダイズは、アレルゲン食品の一つであり、ダイズ種子で同定されている多くのアレルゲンタンパク質の中で、65%以上の患者の血清が認識する最も重要なアレルゲンタンパク質が *Gly m Bd 30K* である。しかし、*Gly m Bd 30K* の植物体内における発現及び機能については明らかにされていない。そこで本論文ではアレルゲンタンパク質 *Gly m Bd 30K* の遺伝子の構造と発現に関する解析を行った。

1章の緒論では、研究の背景、意義と目的について述べている。

2章では *Gly m Bd 30K* 遺伝子のクローニングと発現解析を行った。*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、2クローン (B7、B9) の全塩基配列を決定した。クローンB7、B9は同じ位置に3つの異なる長さのイントロンを持っていた。解析の結果、クローンB7はfunctional遺伝子で、クローンB9のタンパク質コード領域には多くの終止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。また *Gly m Bd 30K* の転写開始点はATGよりも39塩基上流にあることが5'-RACE法により確認できた。*Gly m Bd 30K* 遺伝子発現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。

3章では *Gly m Bd 30K* 遺伝子のプロモーター領域の解析を行った。クローンB7のATGより上流約1500塩基のプロモーター領域をGUS遺伝子と連結してシロイヌナズナに形質転換した。GUS遺伝子はダイズと同様登熟種子で最も強く発現しており、莢では登熟が進むに従って発現は少なくなった。発芽種子でもGUS遺伝子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。ダイズ同様、形質転換体シロイヌナズナにおいて *Gly m Bd 30K* プロモーターによる十分な器官特異的GUS発現を検出することができたことから、ATGより約1500塩基上流領域内に種子における発現を制御している部位が存在していることが示唆された。

4章では *Gly m Bd 30K* のエリシター応答性について解析した。syringolide処理区のダイズ葉では、抵抗性品種と非抵抗性品種で共に発現量が増加していることが確認できた。サリチル酸処理区では、両品種で同じ増加傾向を示し、アブシジン酸処理区では両品種で共に若干の増加が見られた。したがって *Gly m Bd 30K* は抵抗性機構の初期のシグナル伝達に関わる可能性が示唆された。また、クローンB7のプロモーター領域をGUS遺伝子に連結し、タバコ懸濁培養細胞に導入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、500塩基から4646塩基の領域内にsyringolide応答性シスエレメントが含まれていることが推測された。またプロモーター内に含まれるサリチル酸、ジャスモン酸応答性エ

レメントの機能が示唆された。

5章ではダイズの形質転換手法の検討を行った。遺伝子工学的手法を用いて遺伝子発現を抑制することにより、*Gly m Bd 30K*を低減化させることが効果的であると考えられるが、ダイズでは未だ効率の高い形質転換方法が確立されていないことから、3種類の形質転換方法について検討を行った。第1に、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、キメラ個体が生じる率が高いと考えられた。第2に、アズキにも*Gly m Bd 30K*タンパク質が多く含まれていることから、アズキの胚軸にアグロバクテリウムを感染させ、形質転換体を再分化させる方法を試みた。高いシュート形成率が示され発根培地上で発根できた個体数は少なかったが、形質転換体が得られた。第3に、ダイズの未熟子葉由来の体細胞胚にパーティクルガンで遺伝子導入を行った。PCRの結果から、*Gly m Bd 30K*コード領域の遺伝子導入は確認できなかったが、ハイグロマイシン抵抗性遺伝子の導入は確認できた。

以上本論文は、ダイズの最も重要なアレルゲンタンパク質である*Gly m Bd 30K*遺伝子の構造と発現特性について明らかにするとともに、ダイズ形質転換方法に関する詳細な検討を行ったものであり、学術上、応用上貢献することが少なくない。よって審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。