

ダイズのアレルゲンたん白質の遺伝子のクローニング

Cloning of the Genes for an Allergenic Protein in Soybean

高野哲夫・野口 勇 (東京大学農学部附属農場)

李 陶・喜多村啓介 (農林水産省農業研究センター)

Tetsuo TAKANO¹, Tao LI², Isamu NOGUCHI¹ and Keisuke KITAMURA²

¹ University Farm, Faculty of Agriculture, The University of Tokyo,
Tanashi 188

² National Agriculture Research Center, Tsukuba 305

ABSTRACT

Gly m Bd 30K is a major allergenic protein in soybean seed. We have isolated two cDNA clones for *Gly m Bd 30K* and we screened a genomic library of soybean using a cDNA clone as a probe. Twelve positive clones were obtained. Among them, B7 and B9 were identified to contain the genes which have homology to *Gly m Bd 30K* genes. DNA fragments (PB7, PB9 and PSU) which contain coding region of the protein were amplified by PCR using phage DNA of B7 and B9, and genomic DNA of variety 'Suzuyutaka' as templates. They were cloned and sequenced. Comparing amino acid and nucleotide sequences of the PB7, PB9 and PSU, it was clarified that PB9 is the different gene from PB7 and PSU. The result of genomic southern hybridization of the soybean varieties using *Gly m Bd 30K* cDNA as a probe also suggested the presence of two copy of the gene. *Rep. Soy Protein Res. Com., Jpn.* **16**, 58-61, 1995.

大豆種子にはアトピー性皮膚炎等のアレルギー疾患の原因となるアレルゲンたん白質が多数含まれる。その中で、アレルギー患者のIgE抗体と最も高頻度で結合性を示すたん白質が*Gly m Bd 30K*として同定されている¹⁾。一方でこのたん白質はthiol proteaseと相同性があり²⁾、液胞に局在してoil-bodyと親和性を持つP34たん白質³⁾と同一であることが知られている⁴⁾。また、ダイズ油の合成に関与するdiacylglycerol acyltransferaseとP34とのアミノ酸配列がほぼ一致することも最近報告された⁵⁾。私たちは*Gly m Bd 30K*を低減化してアレルゲン性を低減化したダイズを育成することを目指しているが、そのためにはこのたん白質の機能や遺伝子発現について基礎的な知見を得ることが必要である。また、このたん白質の遺伝子のプロモーターは、遺伝子操作などを試みる際に有用であると考えられる。そこで*Gly m Bd 30K*遺伝子のクローニングを行った。

実験方法

Gly m Bd 30K cDNAのクローニング

大豆品種スズユタカの登熟種子からmRNAを精製した。P34cDNA²⁾の3'末端の塩基配列に相補的な30塩基のオリゴヌクレオチドを合成し、これをプライマーとして用いてcDNAを合成した。cDNAをプラスミドpT7T3 18U (ファルマシア) の*EcoRI*サイトに挿入し、ミニライブラリーを作製した。ライブラリーのクローンをランダムに取って、プラスミドDNAを精製し、制限酵素分析によって、スクリーニングを行った。

*Gly m Bd 30K*の遺伝子のクローニング

*Gly m Bd 30K*のcDNA (2-22) をプローブとして、Clontech社のダイズ・ゲノミックライブラリー (品種: Resnik) をスクリーニングした。ポジティブなクローンのファージDNAを精製し、定法に従って制限酵

素による切断，サザンハイブリダイゼーションによる分析を行った。必要に応じてプラスミドへのサブクローニング，PCRによる増幅を行い，塩基配列を決定した。

サザンハイブリダイゼーション

大豆 6 品種（系統）（伊予大豆，緑色這性，東山170号，関系 5，赤莢および上村程野在来）の緑葉からゲノミックDNAを精製した。制限酵素 *Bam*HI，*Eco*RI，*Hind*III で切断したゲノミックDNA各 4 μg を電気泳動した後にナイロンメンブレンにブロットングし，ECL法（アマシャム）でラベルした *Gly m* Bd 30K の cDNA (2-22) をプローブとしてハイブリダイゼーションを行った。

結果および考察

ランダムに選んだクローンのプラスミドDNAを制

限酵素で切断しP34cDNAの制限酵素地図と比較した。その結果，P34cDNAと同一と思われるクローン：1-24，2-22が得られたので，部分的に塩基配列を決定したところ，1-24はP34cDNAより 5' 方向に約1400 bp 長く，2-22は約30 bp 5' 側が短い，ともにP34cDNA と相同な部分を含み，*Gly m* Bd 30K の cDNA であることが解った。

Gly m Bd 30K cDNA (2-22) をプローブとしてゲノミックライブラリーをスクリーニングしてポジティブなクローンを12個得た。そのうちのB7，B9の2つのクローンについて解析を行った。B9のファージDNAを鋳型として，*Gly m* Bd 30K cDNAの両端部分をプライマーとするPCRを行ったところ，B9で cDNA よりも約500 bp 大きなDNA断片 (PB9) が得られた。また，PB7のファージDNAと品種スズユタカのゲノミックDNAとを鋳型として同様にPCRを行うと，PB9よりも約100 bp 小さなDNA断片 (PB7，PSU) が得られ

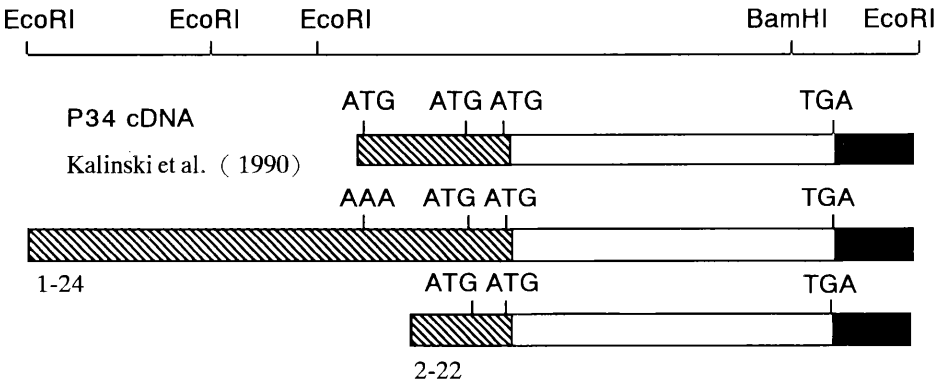


Fig. 1. Structure of cDNAs for *Gly m* Bd 30K. White boxes indicate the coding region for mature *Gly m* Bd 30K protein.

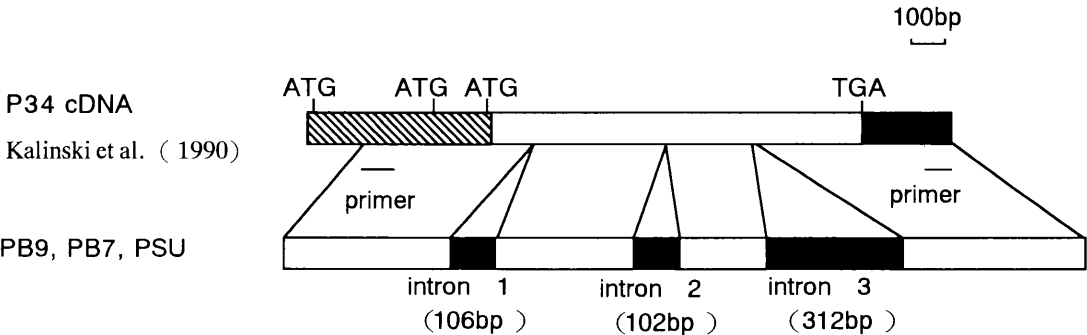


Fig. 2. Structure of the genes for *Gly m* Bd 30K. Black boxes indicate introns. The size of introns are for PB9.

た。そこでこれらをTAクローニングベクター (Invitrogen) にクローニングしてディレクションシリーズを作製し、塩基配列を決定した。

PB7, PB9とPSUはともに*Gly m Bd 30K* cDNAのPCRで増幅される領域をすべて含み、*Gly m Bd 30K* 遺伝子の一部分であると推定された。PB9には106 bp, 102 bp, 312 bpの3つのイントロンが認められた (Fig. 1)。PB7とPSUも同じ位置に3つのイントロンを持っていたが、3番目のイントロンがPB9よりも100 bp短かった。また、イントロンの両端の配列はすべてGT-AG ruleに合致していた。

PB7, PB9, PSUの翻訳領域、およびP34cDNAの4クローンの相同性を比較すると、PSUとP34とが塩基配列で98%、アミノ酸配列で97%の相同性を示すのに

対して、PB9と他の2つとの相同性は塩基配列で約90%、アミノ酸配列で約80%と低かった (Table 1)。したがって、PB9はPB7, PSU, P34cDNAとは異なった種類の遺伝子であると考えられる。

大豆6品種についてゲノミックサザンハイブリダイゼーションを行ったところ、これまでに解析した*Gly m Bd 30K* 遺伝子の内部に切断部位を持たない*EcoRI*と*HindIII*を用いた場合に、メジャーな2本のバンドが検出された。このことから、大豆ゲノムに相同性の高い遺伝子が2コピーあることが強く示唆された。また、*EcoRI*を用いた場合にRFLPが観察された。

サザンハイブリダイゼーションによる分析の他に、我々は抗*Gly m Bd 30K*抗体を用いたSDS-PAGE・イムノプロット法によって、多数の大豆品種、 γ 線照射したM2種子、ソルマメの系統などを調査したが、*Gly m Bd 30K*が顕著に低下した変異やバンドの移動度が変化した変異は認められなかった⁶⁾。したがって、既存の遺伝子を導入することによってこのたん白質を遺伝的に低減した大豆品種を育成することはできないので、遺伝子操作を利用した育種が期待される。現在、パーティクルガンを用いた大豆の形質転換について検討を進めており、最初に*Gly m Bd 30K*のアンチセンス鎖の導入を試みる予定である。

文 献

- 1) Ogawa T, Bando N, Tsuji H, Okajima K,

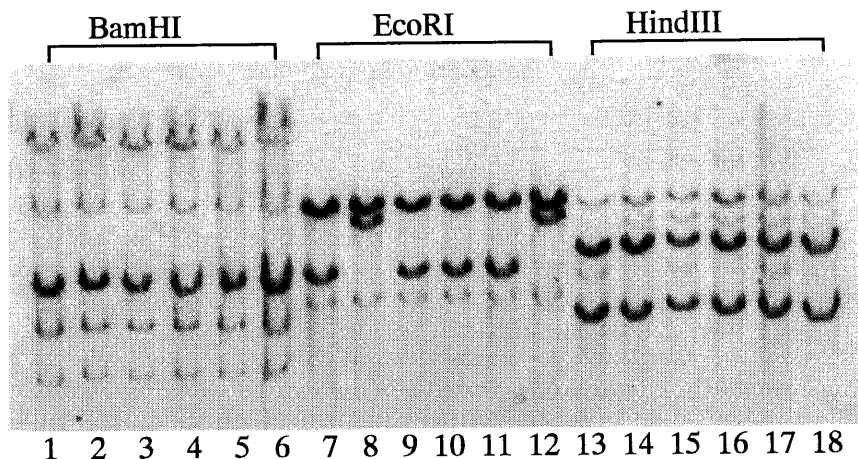


Fig. 3. Southern blot analysis of *Gly m Bd 30K* genes of soybean. Genomic DNA (4 μ g) digested with *Bam*HI (1-6), *Eco*RI (7-12) and *Hind*III (13-18) were electrophoresed, transferred to nylon membranes and hybridized to *Gly m Bd 30K* cDNA labeled by ECL labeling system (Amersham). Lanes 1, 7, 13; Iyodaizu: lanes 2, 8, 14; Ryokushokushasei: lanes 3, 9, 15; Tousan 170: lanes 4, 10, 16; Kankei 5: Lanes 5, 11, 17; Akasaya: lanes 6, 12, 18; Uemurateinozairai.

- Nishikawa K and Sasaoka K (1991) : Identification of the IgE-binding proteins in soybeans by immunoblotting with the sera of soybean-sensitive patients with atopic dermatitis. *J Nutr Sci Vitaminol*, **37**, 555-565.
- 2) Kalinski A, Weisemann JM, Matthews BF and Hermann E M (1990) : Molecular cloning of a protein associated with soybean seed oil bodies that is similar to thiol proteases of the papain family. *J Biol Chem*, **265**, 13843-13848.
 - 3) Kalinski A, Melroy DL, Dwivedi RS and Hermann EM (1992) : A soybean vacuolar protein (P34) related to thiol proteases is synthesized as a glycoprotein precursor during seed maturation. *J Biol Chem*, **267**, 12068-12076.
 - 4) Ogawa T, Tsuji H, Bando N, Kitamura K, Zhu Y-L, Hirano H and Nishikawa K (1993) : Identification of the soybean allergenic protein, *Gly m* Bd 30K, with the soybean seed 34 kDa oil-body-associated protein. *Biosci Biotech Biochem*, **57**, 1030-1033.
 - 5) Kwanyuen P, Wilson RF, Dewey RE and Settledge SB (1994) : Molecular biology and proposed catalytic mechanism of oil synthesis in soybean cotyledons. *Abstracts of 5th World Soybean Research Conference*, 8.
 - 6) 李 陶, 高野 哲夫, 日浦華子, 喜多村啓介 (1995) : 豆類における大豆アレルゲンタンパク質Bd 30Kおよびその遺伝子の分布. 育種学雑誌, **45**, 別1, 268.