

ダイズの形質転換技術の効率化とそれを利用した アレルゲンたん白質の低減化

高野哲夫*¹・李 陶²・金田裕一³・喜多村啓介⁴

¹東京大学アジア生物資源環境研究センター ²岩手生物工学研究センター

³明治大学農学部 ⁴農業研究センター豆類育種研究室

Lowering the Content of an Allergic Protein Through Efficient Transformation in Soybean Seed

Tetsuo TAKANO¹, Tao LI², Yuichi KANEDA³ and Keisuke KITAMURA⁴

¹Asian Natural Environmental Science Center, The University of Tokyo, Tokyo 188

²Iwate Biotechnology Research Center, Kitakami 024

³Faculty of Agriculture, Meiji University, Kawasaki 214

⁴National Agriculture Research Center, Tsukuba 305

ABSTRACT

Gly m Bd 30K is a major allergenic protein in soybean seed. To obtain a soybean line lacking *Gly m* Bd 30K, we introduced plasmids containing the antisense cDNA for *Gly m* Bd 30K into soybean hypocotyl segments via particle bombardment. At first, we investigated the optimum condition of bombardment using GUS reporter gene. The highest transient GUS expression was observed when 1,300 psi rupture disc was used, the distance between stopping screen and the soybean sample was 9 cm, and 2 shots were made per petri dish. Under this condition, we introduced a plasmid (pBI Bd30KA) which contained antisense cDNA for *Gly m* Bd 30K driven by CaMV35S promoter, and kanamycin resistant marker gene into hypocotyl segment of soybean. The hypocotyl segments were cultured on the 1/2 L2 agar medium containing 2 mg/L of thidiazuron (TDZ). Although many shoots regenerated from the segment, which were transferred to the selection medium containing 100 mg/L kanamycin, no transgenic soybean plant was obtained because all the shoots died eventually through selection. *Rep. Soy Protein Res. Com., Jpn.* **17**, 14-18, 1996

Key words : soybean, transformation, antisense, particle bombardment, allergenic protein

ダイズ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が、

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

*〒188 東京都田無市緑町 1-1-1

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⁾。私たちは *Gly m Bd 30K* を低減化することによりアレルゲン性の低下したダイズを育成することを目指しているが、このたん白質が欠失した、または顕著に低減したダイズ品種・近縁野生種はみつかっていないため⁵⁾、遺伝子操作による育種が望まれる。

遺伝子の発現を制御するための方法はいくつか知られているが、アンチセンス RNA を用いる方法は有効な方法の 1 つであり、実用面を含めて多くの成功例がある⁶⁾。そこで本研究ではアンチセンス *Gly m Bd 30K* RNA を発現する形質転換ダイズを作成することを目的とした。ダイズは形質転換の困難な作物の 1 つであり、エレクトロポレーション⁷⁾、アグロバクテリウムの利用⁸⁾、パーティクルガン⁹⁾などにより形質転換ダイズが作出された報告があるが、再現性の問題、遺伝子型（品種）の制限、実験の困難さ等があり、まだまだ改善の余地は大きい。そこで本研究では、安定して再分化植物の得られる、ダイズ下胚軸からの不定芽誘導の実験系を用いて、パーティクルガンによる形質転換を試みた。

方 法

ダイズ下胚軸の調製

形質転換に用いる下胚軸は、金田ら¹⁰⁾の方法に従って調製した。ダイズ品種ボンミノリの種子を次亜塩素酸ナトリウム水溶液で表面殺菌し、寒天培地上に無菌播種した。22°Cで14日間培養した実生から下胚軸を切

り出した。不定芽が誘導される部位である下胚軸上部切断面を上向きにして、1シャーレあたり20本の切片を寒天培地上に立て、形質転換に用いた。

パーティクルガンによる形質転換

パーティクルガンとして Biolistic PDS-1000/He (Bio-Rad) を用い、Hagio et al.¹¹⁾の方法に従って金粒子にコーティングしたプラスミドを、1,100または1,300 psi 規格のラプチャーディスクを用い、トッピングスクリーンから約90 mmの距離にある下胚軸上部に1～2回打ち込んだ。その後、2 mg/Lのthidiazuron (TDZ) を含む1/2 L2寒天培地上で2日間培養し、レポーター遺伝子である GUS のtransientな発現を組織化学的に検出した。アンチセンス Bd30KcDNA を打ち込んだ後は、金田ら¹⁰⁾の方法に従い下胚軸を培養し、100 mg/Lのカナマイシンで形質転換植物の選抜を行った。

Bd30KcDNA を組み込んだプラスミドの構築

pBI121の、CaMV35S プロモーターの下流の GUS 遺伝子の位置に *Gly m Bd 30K* cDNA であるクローン2-22¹²⁾のセンスおよびアンチセンス鎖を組み込んだプラスミド pBI Bd30KA を構築した (Fig. 1)。

結果および考察

最初に、遺伝子を打ち込む条件について検討した。金粒子にコーティングしたプラスミド pBI121をダイ

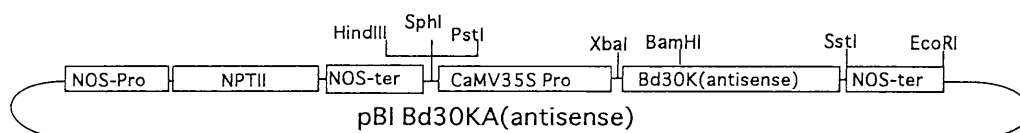


Fig. 1. Schematic construction of the binary vector of pBI Bd30KA.

Table 1. The investigation of the condition of bombardment

Rupture disk (psi)	Number of shot/ Petri dish	Number of petri dish bombarded	% of Segments with GUS expression	Number of blue spot/Segment
1,100	1	3	15.0	0.2±0.51
	2	3	33.3	1.1±2.52
1,300	1	3	33.3	1.1±2.41
	2	2	52.5	1.9±3.96

Plasmid (pBI121) was bombarded into the hypocotyl segment of soybean. Transient GUS gene expression was detected histochemically after 2 days of culture on agar medium.

ズ下胚軸に打ち込み, transient な GUS の発現を調べた. 2 種類のラブチャーディスクで, 1~2 回の打ち込みを行ったところ, 1,300 psi のラブチャーディスクを用いて 1 シャーレあたり 2 回の打ち込みを行った場合に GUS の発現する切片の割合, 1 切片当たりのブルスポット数がともに最も高くなった (Table 1). その場合でも 1 切片当たりのブルスポット数は 1.9 個と高くなかったが, 切片によっては数十のブルスポットが観察できた (Fig. 2). しかしながらこの結果は, 効率よく形質転換体を得るためには不十分であ

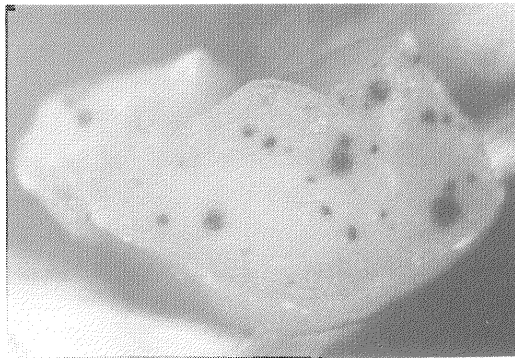


Fig. 2. Transient GUS gene expression on the surface of hypocotyl segment of soybean.

り, さらに条件を検討して発現効率を向上させる必要がある. また, 今回用いたプラスミドは GUS 遺伝子が CaMV35S プロモーターでドライブされているが, このプロモーターがダイズ組織内での transient な発現を検出する上で適当かどうか明らかにする必要がある.

次に *Gly m Bd 30K* のアンチセンス cDNA を組み込んだプラスミド pBI Bd30KA をダイズ下胚軸に打ち込み, *Gly m Bd 30K* のアンチセンス RNA を発現する形質転換体を得ることを試みた. 金粒子にコーティングした pBI Bd30KA を, 1,300 psi のラブチャーディスクを用いて, 1 シャーレあたり 2 回ダイズ下胚軸に打ち込んだ. 遺伝子導入後の下胚軸を寒天培地上で培養し, 不定芽の誘導を行った結果, pBI Bd30KA を打ち込んだ下胚軸からも不定芽の再分化が見られたため, 形質転換体を得るために 100 mg/L のカナマイシンによる選抜を行った. その結果, 不定芽はしだいに黄化し, 最終的にすべての不定芽が枯死した.

本研究では目的とした形質転換ダイズが得られなかったが, 今後効率よく形質転換体を得るために必要な点がいくつか示唆された. (1) 本実験では, 形質転換体の選抜に, nopaline synthase (NOS) のプロモーターにドライブされるカナマイシン抵抗性遺伝子を用いたが, このプロモーターのダイズ組織内での発現量



Fig. 3. Regenerated shoot from the hypocotyl segment of soybean bombarded with pBI Bd30KA, which contains antisense cDNA for *Gly m Bd 30K*. Shoots are selected on the agar medium containing 100 mg/L of kanamycin.

が不十分であることが考えられる。そこで、アンチセンス *Gly m Bd 30K* cDNA の上流に、CaMV35S プロモーターにドライブされるハイグロマイシン抵抗性遺伝子を組み込んだプラスミドをすでに構築しており、ハイグロマイシンによる選抜を試みる予定である。(2)本実験ではパーティクルガンによる遺伝子導入に下胚軸切片を用いた。下胚軸から不定芽を誘導する方法は極めて安定して再分化植物が得られる実験系であ

るが、この系の、パーティクルガンによる形質転換に対する有効性についてさらに検討する必要がある。パーティクルガンを用いた形質転換では、ダイズ未熟子葉から誘導された不定胚を用いた実験系を用いて形質転換植物が得られているが⁹⁾、さらに安定して形質転換ダイズを得るための植物体再分化の実験系の開発が望まれる。

要 約

主要なアレルゲンたん白質である *Gly m Bd 30K* が遺伝的に低減化したダイズを育成することを目的として、アンチセンス *Gly m Bd 30K* RNA を発現する形質転換ダイズを、パーティクルガンを用いた形質転換によって作成することを試みた。最初に遺伝子を打ち込む条件について検討し、GUS の transient な発現を検出することによって、最適な打ち込みの条件を決定した。そこで *Gly m Bd 30K* cDNA のアンチセンス鎖とカナマイシン抵抗性遺伝子とを組み込んだプラスミドを構築し、パーティクルガンでダイズ下胚軸に打ち込んだ。遺伝子を導入した下胚軸から不定芽が再分化したので、形質転換体を得るためにカナマイシンによって選抜を行った。その結果、不定芽はしだいに黄化し、最終的にすべての不定芽が枯死したため、形質転換ダイズを得ることは出来なかった。

文 献

- 1) Ogawa T, Bando N, Tsuji H, Okajima K, Nishikawa K and Sasaoka K (1991) : Investigation of the IgE-binding proteins in soybeans by immunoblotting with the sera of the soybean-sensitive patients with atopic dermatitis. *J Nutr Sci Vitaminol*, **37**, 555-565.
- 2) Kalinski A, Weisemann JM, Matthews BF and Herman EM (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 Herman 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) 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 *Bd30K* およびその遺伝子の分布. 育種学雑誌, **45**, 別1, 268.
- 6) Smith CJS, Watson CF, Ray J, Bird CR, Morris PC, Schuch W and Grierson D (1988) : Antisense RNA inhibition of polygalacturonase gene expression in transgenic tomatoes. *Nature*, **334**, 724-726.
- 7) Dhir SK, Dhir S, Savka MA, Belanger F, Kriz AL, Farrand SK and Widholm JM (1992) : Regeneration of transgenic soybean (*Glycine max*) plants from electroporated protoplasts. *Plant Physiol*, **99**, 81-88.
- 8) Zhou JH, Atherly AG (1990) : *In situ* detection of transposition of the maize controlling element (Ac) in transgenic soybean tissues. *Plant Cell Reports*, **8**, 542-545.
- 9) Sato S, Newell C, Kolacz K, Tredo L, Finer J and Hinchey M (1993) : Stable transformation

- via bombardment in two different soybean regeneration systems. *Plant Cell Reports*, **12**, 408-413.
- 10) 金田裕一, 田部井 豊, 西村繁夫, 秋濱友也, 原田久也(1995): ダイズの効率的な不定芽誘導法とアグロバクテリウムによる形質転換条件の検討. 育種学雑誌, **45**, 別 1, 140.
 - 11) Hagio T, Hirabayashi T, Machida H and Tomotsune H (1995) : Production of fertile transgenic barley (*Hordeum vulgare* L.) plant using the hygromycin-resistance marker. *Plant Cell Reports*, **14**, 329-334.
 - 12) 高野哲夫, 李 陶, 野口 勇, 喜多村啓介(1995): ダイズアレルギーたん白質の遺伝子のクローニング. 大豆たん白質研究会会誌, **16**, 58-61.