

九州大学農学部  
遺伝子資源開発研究センター

年報

第1号

平成9年

九州大学農学部附属遺伝子資源開発研究センター

## 発刊に当たって

九州大学農学部では、昭和62年度に、本遺伝子資源開発研究センターの前身である附属遺伝子資源研究センターが10年の時限施設として設置されました。この旧センターは、バイオサイエンスとバイオテクノロジーの研究素材である遺伝子資源の収集、保存、開発、評価から利用に至る一貫した基礎的応用的研究を総合的に遂行し、多大な成果を挙げ、国際的に高い評価を得てきました。しかし、その間、これからセンターとして推進すべき課題も幾つか生じました。

近年、ゲノム解析の著しい進展により、遺伝情報に基づく遺伝子産物の機能解明や利用が、次世代のバイオサイエンスとバイオテクノロジー研究の重要課題となっておりますが、これらは、また、将来センターとしても推進すべき最重要課題でもありません。これらの課題を推し進めるためには、10年時限の到来を機会に、センターが、遺伝子レベルでの農業遺伝子資源に関する応用展開研究と戦略的プロジェクト研究の推進並びに遺伝子資源のDNA・細胞レポジトリ機能の充実を図るセンターに発展することが必要であると強く文部省に要望いたしました。

遺伝子資源研究センターは平成8年度末をもって廃止になりましたが、平成9年度より、農学部長、農学部事務長をはじめ多くの方々のご支援により、申請の意義が認められ、新たに、遺伝子資源開発研究センターとして恒久的な施設に変身しました。

組織的にも、研究体系的にも大きな転換を迎えたこの時に当たり、本センターの活動状況を記録に残し、将来の課題推進と当センター利用の手引書として、ここに年報を刊行することにしました。

今後とも、本センターにご支援ご鞭撻賜りますようお願い申し上げます。

代表して

緒方 靖哉

## 目次

I. センター概要	1
1. 目的	
2. 沿革	
3. 組織	
4. 研究および事業内容	
5. 運営委員会委員	
6. 組織図	
II. 研究成果	4
1. 研究業績・出版物リスト	
2. 原著論文要旨	
3. 総説等要旨	
4. 講演要旨	
III. センターの活動状況	58
1. 教育活動	
2. 科研・共同・受託研究	
3. 講演会・セミナー・講習会	
4. 海外渡航	
IV. 遺伝子資源系統の保存・管理	66
V. センター規程	73
VI. 英文摘要	75
VII. センター研究棟配置図	77

編集後記

# 1. センターの概要

## 1. 目的

本センターは、遺伝子資源の収集、保存、開発から評価、利用に至る研究教育を遂行する。特に、高度な技法で遺伝情報の解析を行い、遺伝子レベルでの農業遺伝子資源に関する応用展開研究と戦略的プロジェクト研究の推進並びに遺伝子資源のDNA・細胞レポジトリ機能の充実を図る。

## 2. 沿革

昭和62年5月 本学附属家蚕遺伝子実験施設を振替え、附属遺伝子資源研究センターが10年の時限施設として設置され、教授、助教授、助手各2名が配置された。

平成元年4月 教授、助教授各1が追加配置された。  
本学大学院農学研究科に設置された独立専攻遺伝子資源工学専攻の協力講座として、昆虫遺伝子資源学、遺伝子開発管理学の2講座に参加した。

平成3年4月 遺伝子資源工学専攻に微生物遺伝子工学講座が新設され、これに参加した。

平成9年4月 附属遺伝子資源研究センターは時限により廃止され、新たに、教授3名、助教授3名、助手2名の振替えによって附属遺伝子資源開発研究センターが設置された。

## 3. 組織・職員

センター長 緒方 靖哉

### 家蚕遺伝子開発分野

教授 藤井 博

助教授 伴野 豊

技官 国分 次雄

技官 西川 和弘

技官

技術補佐員

非常勤研究員

研究推進支援員

西坂 章文

堺和 勝彦

夏 慶友

焼山 正敏

#### 植物遺伝子開発分野

教授 佐藤 光

助教授 熊丸 敏博

研究推進支援員 孫 民榮

非常勤補佐員 飯田 恵美子

#### 微生物遺伝子開発分野

教授 緒方 靖哉

助教授 原 敏夫

講師 土居 克実

研究推進支援員 西田 壽子

### 4. 研究と事業内容

#### 家蚕遺伝子開発分野

カイコ遺伝子資源の保存、開発と評価並びに遺伝子機能の発現機構の解明とトランスジェニックカイコの作製に関する研究

#### 植物遺伝子開発分野

イネ遺伝子資源のDNAレベルでの開発と評価、保存と利用、並びに遺伝子工学的手法を用いた新遺伝子資源の開発に関する研究

#### 微生物遺伝子開発分野

微生物遺伝子資源の探索と評価、保存と利用開発、並びに有用遺伝子の高度機能化と応用展開に関する研究

各分野とも、所定の許可を得た本学部内外の学生や研究者等に対し、研究の場や遺伝子資源材料を提供し、さらに研究指導と教育を行っている。

### 5. 運営委員会委員

委員長 緒方 靖哉

教授 佐藤 光 (センター)

教授 藤井 博 (センター)

助教授 原 敏夫 (センター)

教授 古賀 克巳

教授 松山 宣明

教授 吉村 淳 (農学科)

教授 古川 謙介 (農芸化学科)

教授 斉藤 明 (林学科)

教授 石崎 文彬 (食糧化学工学科)

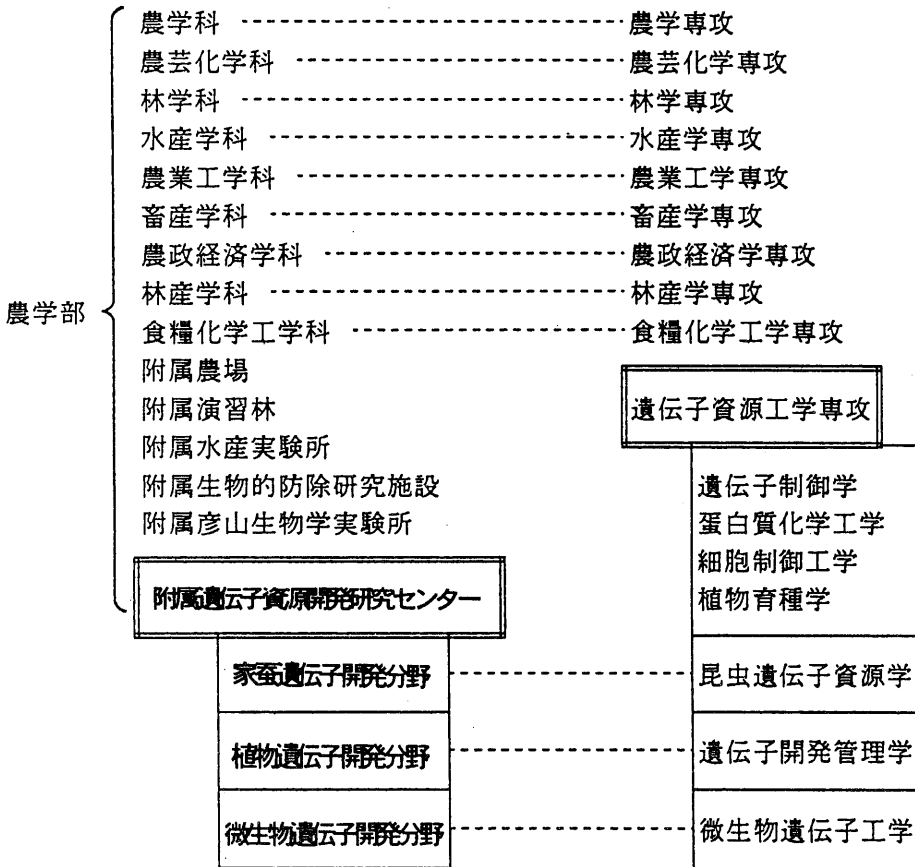
教授 久原 哲 (遺伝子資源工学専攻)

助教授 若菜 章 (農場)

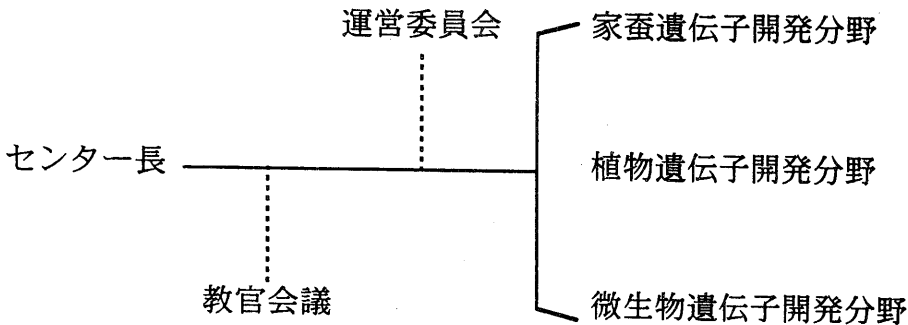
教授 堺 正紘 (演習林)

6. 組織図

組 織



(注) 上記の組織は平成10年度以降、農学部の改組・大学院重点化により変更される。



## II. 研究成果

### 1. 研究業績・出版物リスト

#### 家蚕遺伝子開発分野

##### A 原著論文

- Y. Banno, K. Sakaida, T. Nakamura, K. Tsuchida, Y. Kawaguchi, K. Koga and H. Doira: "Reassessment of mapping of the E homeotic gene complex of *Bombyx mori* by linkage analysis and *in situ* hybridization with an *Anthrenapedia* clone as probe." *J. Seric. Sci. Jpn.*, 66(3), 151-155. (1997)
- Y. Banno, H. Goto, M. Yasuoka, T. Nakamura, Y. Kawaguchi, K. Koga and H. Doira: "Genetic studies on the sex-linked non-molting mutant, nm-s, of *Bombyx mori*." *J. Seric. Sci. Jpn.*, 66(5), 351-355. (1997)
- Kawaguchi Y., Yamada H., Banno Y., Koga K. and Doira H. "Genetic analysis of the translucent-15 mutant in *Bombyx mori*." *J. Seric. Sci. Jpn.*, 66 (2), 113-115 (1997)
- Kawaguchi Y., Akagi S., Banno Y., Koga K., Kuwano E. and Doira H. "Protein profiles of larval hemolymph of *Bombyx mori* in artificially induced trimolting larvae using a 1,5-disubstituted imidazole." *J. Fac. Agr., Kyushu Univ.*, 42, 203-209 (1997)
- K. Shirai, H. Fujii, and H. Doira: "Purification and characterization of a chymotrypsin inhibitor with an oligosaccharide chain from the hemolymph of *Bombyx mori*." *J. Seric. Sci. Jpn.*, 66, 253-260. (1997)
- Y. Kawaguchi, M. Iwakuma, Y. Banno and K. Koga: "Alteration of egg character in the emi mutation of *Bombyx mori* by the application of 20-hydroxyecdysone." *J. Seric. Sci. Jpn.*, 67, 31-35 (1998)

##### B 著書・総説

- 土田 耕三、伴野 豊、橋戸 和夫: 「カイコ卵母細胞と精母細胞染色体を用いたFluorescence *in situ* hybridization法」日蚕雑 66, 233-241 (1997)

##### C その他

- 西川 和弘、石原 大輔、西坂 章文、坪和 勝彦、国分 次雄、藤井 博: 「カイコの新突然変異、眼紋赤 "ro" の遺伝」九州蚕糸, 28, 25 (1997)

- ・大城戸 利久、藤井 博：「カイコ絹糸腺エステラーゼの発育に伴う変動とその性質」九州蚕糸, 28, 26 (1997)
- ・後藤 弘、伴野 豊、河口 豊、古賀 克己：「遺伝的モザイク系統を用いた不眠蚕油 (*omi*) の解析」九州蚕糸, 28, 27 (1997)
- ・白尾 吏、伴野 豊、中村 隆、河口 豊、古賀 克己：「福岡産クワコの休眠ホルモン-PBAN遺伝子第4イントロンの塩基配列」九州蚕糸, 28, 28 (1997)
- ・中村 隆、伴野 豊・河口 豊・古賀 克己・河原畑 勇：「クワコの外部形態・染色体・アイソザイムに見られる地理的変異」九州蚕糸, 28, 29 (1997)
- ・中村 隆、伴野 豊、河口 豊、古賀 克己、河原畑 勇：「カイコとクワコとの間に見られる生殖隔離の程度」九州蚕糸, 28, 30 (1997)
- ・伴野 豊、中村 隆：「福岡市におけるクワコの分布と発生周期」九州蚕糸, 28, 31 (1997)
- ・河口 豊、伴野 豊、古賀 克己、土井良 宏：「カイコ矮小卵遺伝子 *emi* の形質発現. 卵形成におよぼす 20-hydroxyecdysone の影響」九州蚕糸, 28, 32. (1997)
- ・古澤 寿治・小谷 英治・一田 昌利・杉村 順夫・渡邊 隆夫・池永 満生・坂口 文吾・藤井 博：「カイコの胚発生と分化におよぼす宇宙放射線の影響 スペースシャトル及びミール利用」宇宙実験結果報告会 III-9~17(1997)

## 植物遺伝子開発分野

### A 原著論文

- ・T. Kumamaru, H. Sato and H. Satoh.: "High-lysine mutants of rice, *Oryza sativa* L." *Plant Breed.* 116, 245-249, (1997)
- ・Nakamura, Y., A. Kubo, T. Shimamura, T. Matsuda, K. Harada and H. Satoh.: "Correlation between activities of starch debranching enzyme and  $\alpha$ -polyglucan structure in endosperms of *sugary-1* mutants in rice." *Plant J.* 12(1), 143-153 (1997)
- ・H.Satoh, L. Q. Qu, T. Kumamaru and M. Ogawa.: "Glutelin mutants induced by MNU treatment in rice". *Rice Genet. Newsl.* 14 in press (1997)
- ・Qu L. Q., H.Satoh, T. Kumamaru and M. Ogawa.: "Genetic analyses of glutelin mutants in rice". *Rice Genet. Newsl.* 14 in press (1997)

### B 著書・総説



- ・佐藤 光：「お米と遺伝子 -変わり者のお米をつくる (1) アミロースに関する変異-」筑豊生物、42 : 2-10, (1997)
- ・H.Satoh: Chloroplast. In "Science of the Rice Plant, Vol.III Genetics", eds. T. Matuo, F.Kikuchi and H.Yamaguchi, pp.336-343, 1997

## 微生物遺伝子開発分野

### A 原著論文

- ・C. Kinoshita-Iramina, M. Kitahara, K. Doi and S. Ogata: "A conjugation Linear Plasmid in *Streptomyces laurentii* ATCC31255" *Biosci. Biotech. Biochem.*, 61 (9),1469-1473 (1997)
- ・E. Yokoyama, K. Doi and S. Ogata : "Cloning and sequencing of the *hup* gene encoding the histone-like protein Hsl of *Streptomyces lividans*" *Biochimica et Biophysica Acta* 1353, 103-106 (1997)
- ・F. Inagaki, S. Hayashi, K. Doi, Y. Motomura, E. Izawa and S. Ogata: "Microbial partition in the formation of siliceous deposits from geothermal water and analysis of the extremely thermophilic bacterial community" *FEMS Microbiol. Ecol.*, 24, 41-48 (1997)
- ・E. Yokoyama, K. Doi, M. Kimura, S. Kuhara and S. Ogata: "Histone-like protein of *Streptomyces lividans*" *J. Fac. Agr. Kyushu Univ.*, 43(3・4), 473-482 (1998)

### B 著書・総説

- ・緒方 靖哉：「微生物とその利用」、コロナ社、p.1-194 (1997)
- ・土居克実、江口智子、田中治、森勝美、大桃定洋、緒方靖哉：「サイレージ乳酸菌の機能開発 -フェージタイピングによる簡便な同定法の開発および高機能サイレージ菌株作出-」*生物工程学*、75 (5) 361-363 (1997)
- ・原 敏夫：「納豆のネバネバー $\gamma$ -ポリグルタミン酸の利用」、*化学と教育*、45 (11), 634-635 (1997)
- ・原 敏夫：「放射線による納豆の糸から吸水性樹脂の合成」、*RADIOISOTOPES*、46 (12), 947-948 (1997)
- ・土居克実、横山英之、緒方靖哉：「放線菌の接合性プラスミド」*生物工程学*、76 (2) 66-71 (1998)

### C その他

- S. Ogata: "Memories of Professor Hiroki Murakami", *Cytotechnol.*, 23, 3 (1997)
- 原 敏夫: 「納豆が地球を救う」 4年の化学, 5, 43-49 (1997)
- 原 敏夫: 「納豆の糸から合成した吸水性樹脂」 水, 39, 16-21 (1997)
- 原 敏夫: 「歯医者さんではありません」 週間文春, 6月20日, 102 (1997)
- 原 敏夫: 「"Desert Greening"with Natto」 *Green Age*, 11, 8-9 (1997)
- 原 敏夫: 「納豆の糸から生まれた樹脂が砂漠を緑に変える!」、*Communications*, 5, 2-3 (1997)
- 原 敏夫: 「納豆から新素材」、*鴻都*, 33, 14-15 (1997)
- 原 敏夫: 新エネルギー・産業技術総合開発機構 平成8年度 事業事前調査「グリーン・リサイクルシステム」調査報告書 (1997)
- 緒方 靖哉: 「高機能サイレージ乳酸菌の機能増強と実用化に関する研究」平成7年度～9年度科学研究費補助金(基盤研究A(1))研究成果報告書、p.1-50 (1998)
- 緒方 靖哉: 「バイオテクノロジーにおける法と作法」平成7年度～9年度科学研究費補助金(基盤研究B(1))研究成果報告書、p.1-50 (1998)

## 2. 原著論文要旨

### 家蚕遺伝子開発分野

日蚕雑 68 (3), 151-155 (1997)  
J. Seric. Sci. Jpn.

# Reassessment of mapping of the *E* homeotic gene complex of *Bombyx mori* by linkage analysis and *in situ* hybridization with an *Antennapedia* clone as a probe

YUTAKA BANNO<sup>1)\*</sup>, KOSAKU SAKAIDA<sup>1)</sup>, TAKASHI NAKAMURA<sup>1)</sup>, KOZO TSUCHIDA<sup>2)</sup>,  
YUTAKA KAWAGUCHI<sup>1)</sup>, KATSUMI KOGA<sup>1)</sup> and HIROSHI DOIRA<sup>1)</sup>

1) Faculty of Agriculture, Kyushu University

2) National Institute of Health

(Received Feb.13, 1997)

The gene for a recessive mutant named "soft and limp" (gene symbol *sol*) was shown to be linked with the *E* homeotic pseudoalleles previously mapped to the distal end of the 6th linkage group. A three-point test involving one of the *E* genes (*E<sup>ca</sup>*) and the *F* gene localized on the same linkage group indicated that the arrangement of these three gene loci is in the order of *sol*—*E<sup>ca</sup>*—*F*. Taking the recombination values and correction factors into account, the locus of the *sol* gene was determined to be -21.1 cM of the 6th linkage group. These results suggest that the 0.0 position of this linkage group should be the *sol* gene instead of the *E* loci. This inference was supported by the results of fluorescence *in situ* hybridization with an RNA probe derived from the *B. mori Antennapedia* gene closely linked with the *E* complex loci; the signal was detected at an internal region of a chromosome, not at its distal end.

Key words: *Bombyx mori*, *E* locus, *sol* mutant, FISH, chromosome mapping.

## Genetic studies on the sex-linked non-molting mutation, *nm-s*, of *Bombyx mori*

YUTAKA BANNO<sup>1)\*</sup>, HIROSHI GOTO<sup>1)</sup>, MISAKO YASUOKA<sup>1)</sup>,  
TAKASHI NAKAMURA<sup>1)</sup>, YUTAKA KAWAGUCHI<sup>1)</sup>,  
KATSUMI KOGA<sup>1)</sup> and HIROSHI DOIRA<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>Laboratory of Sericulture and <sup>2)</sup>Institute of Genetic Resources,  
Faculty of Agriculture, Kyushu University

(Received June 14, 1997)

Linkage analysis and three-point cross established a novel, spontaneous *Bombyx mori* mutation, in which newly hatched larvae die without molting. The relevant gene, named *nm-s*, was localized at 3.0 centimorgans on the 1st linkage group; thus it was a sex-linked non-molting gene, never found in previously described non-molting mutants in *B. mori*.

Key words: *Bombyx mori*, non-molting mutation, *nm-s*, sex-linked gene

## Genetic analysis of the “translucent-15” mutant in *Bombyx mori*

YUTAKA KAWAGUCHI<sup>1)\*</sup>, HIDENAO YAMADA<sup>1)</sup>, YUTAKA BANNO<sup>1)</sup>,  
KATSUMI KOGA<sup>1)</sup> and HIROSHI DOIRA<sup>2)</sup>

Laboratory of Sericultural Science <sup>1)</sup> and Institute of Genetic Resources <sup>2)</sup>, Faculty  
of Agriculture, Kyushu University

(Received December 17, 1996)

A recessive mutation was found spontaneously in the f11 strain maintained in Kyushu University. It had characteristics of moderately translucent or oily larval skin. Linkage analysis showed that this gene was linked to the *bl* gene. The novel mutant gene was named translucent-15 (symbol *oft*). It was localized at position 42.7 centimorgans on the 15th linkage group on the basis of a three-point experiment involving *bl* and *Se* as markers.

Key words: *Bombyx mori*, *oft* locus, larval skin character, linkage analysis

**Protein Profiles of Larval Haemolymph of *Bombyx mori*  
in Artificially Induced Trimolting larvae using a  
1,5-disubstituted Imidazole**

**Yutaka Kawaguchi<sup>1)\*</sup>, Shunsuke Akagi<sup>1)</sup>, Yutaka Banno<sup>1)</sup>,  
Katsumi Koga<sup>1)</sup>, Eiichi Kuwano<sup>2)</sup> and Hiroshi Doira<sup>2)</sup>**

<sup>1)</sup>Laboratory of Sericultural Science, <sup>2)</sup>Laboratory of Pesticide Chemistry and  
<sup>3)</sup>Institute of Genetic Resources, Faculty of Agriculture,  
Kyushu University, Fukuoka 812-81, Japan

(Received August 11, 1997 and accepted August 25, 1997)

Trimolter larvae (undergoing three larval molts) of *Bombyx mori* were induced artificially by administering 1-benzyl-5-[(*E*)-2,6)-dimethyl-1,5-heptadienyl]-imidazole (an insect growth regulator called KK-42) shortly after the third molt, and analyzed by polyacrylamide gel electrophoresis for the banding patterns of haemolymph proteins. The features were similar to those previously reported for allatectomy-induced trimolters, which mimicked the trait of the recessive trimolting mutant *rt* rather than that of the dominant trimolting mutant *M*.

日蚕雑 67 (1), 31-35 (1998)  
J. Seric. Sci. Jpn.

**Alteration of egg character in the *emi*  
mutation of *Bombyx mori* by the application  
of 20-hydroxyecdysone**

**YUTAKA KAWAGUCHI\*, MASAKI IWAKUMA,  
YUTAKA BANNO and KATSUMI KOGA**

Laboratory of Sericultural Science, Faculty of Agriculture, Kyushu University

(Received Oct. 10, 1997)

The influence of exogenous 20-hydroxyecdysone on the expression of the miniature egg (*emi*) mutation of *Bombyx mori* was investigated. Female pupae of *emi* injected with the hormone produced larger and heavier eggs than the inherent *emi* eggs. The enlarged *emi* eggs were approximately similar to the normal eggs, indicating that the administration of 20-hydroxyecdysone recovered the inferiority of the *emi* character.

Key words: *Bombyx mori*, miniature egg mutation, induced large *emi* egg, 20-hydroxyecdysone

## Purification and characterization of a chymotrypsin inhibitor with an oligosaccharide chain from the hemolymph of *Bombyx mori*

KOJI SHIRAI, HIROSHI FUJII\*  
and HIROSHI DOIRA

*Institute of Genetic Resources, Faculty of Agriculture,  
Kyushu University, Fukuoka 812-81, Japan*

(Received February 10, 1997)

The chymotrypsin inhibitor CI-8 whose expression is controlled by the *Ict-D* gene was purified from the larval hemolymph of *Bombyx mori* by a series of chromatography using DEAE-Sepharose, Con A-Agarose and Butyl-Toyopearl. CI-8 was a protein with a pI of 5.0 and a molecular weight of 42,000. This inhibitor was found to contain an oligosaccharide chain. The inhibitory activity of CI-8 decreased under acidic conditions while it was remarkably stable under alkaline conditions. Its activity completely lost at 65°C at pH 7.0. CI-8 strongly inhibited bovine pancreatic chymotrypsin and *B. mori* digestive protease and also weakly a protease from *Beauveria bassiana*, which is a fungus pathogenic to *B. mori*. The antiserum raised against CI-8 reacted to the chymotrypsin inhibitors CIs-6 and 7 controlled also by the allelic genes of the *Ict-D* locus but not with other chymotrypsin inhibitors controlled by the *Ict-A*, *Ict-B*, *Ict-E* and *Ict-H* genes.

Key words: *Bombyx mori*, hemolymph, chymotrypsin inhibitor, oligosaccharide chain

## High-lysine mutants of rice, *Oryza sativa* L.

T. KUMAMARU<sup>1</sup>, H. SATO<sup>2</sup> and H. SATOH<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Institute of Genetic Resources, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Hakozaki, Fukuoka 812-81, Japan; <sup>2</sup>Zen-noh Agricultural Technical Center, Hiratsuka, Kanagawa 254, Japan; <sup>3</sup>Corresponding author

With 1 figure and 4 tables

Received June 10, 1995/Accepted January 29, 1997

Communicated by P. Ruckebauer

### Abstract

In order to improve the nutritive value of rice protein, it is necessary to increase the level of lysine and threonine. Ten high-lysine mutants were selected from N-methyl-N-nitrosourea-induced (MNU-induced) mutant lines, using high-performance liquid chromatography for amino acid analysis. The lysine content of these mutants ranged from 5.10% to 6.38% of total amino acids, while that of the original varieties was about 4%. All high-lysine mutants also had a greatly increased histidine content and a floury endosperm. An increase in lysine content of the albumin/globulin fraction was characteristic of the MNU-induced high-lysine mutants. The segregation ratio of normal to floury endosperm in the F<sub>2</sub> seeds from a cross between 'Kinmaze' and a high-lysine mutant fitted the expected 3:1 ratio. The high level of lysine and the floury endosperm may be controlled by the same gene.

**Key words:** *Oryza sativa* — endosperm — high-lysine — protein

The protein in rice endosperm is of good quality compared with that of other cereal crops, but both lysine and threonine are present at limiting levels. It is therefore, necessary to increase the nutritive value of rice protein by increasing the levels of these two amino acids. The search for and evaluation of genetic resources provide a means for the achievement of this aim.

High-lysine mutants have been reported in maize (Mertz et al. 1964, Nelson et al. 1965), barley (Munck et al. 1970, Doll et al. 1974, Kreis and Doll 1980) and sorghum (Singh and Axtell 1973).

Shin et al. (1977) reported high-lysine in the rice variety 'Hiyamizu'. Schaeffer and Sharpe (1987) reported the selection of high-lysine mutants from cell cultures. However, the amino acid content of the rice endosperm has not yet been sufficiently improved and further searches for genetic resources are necessary.

Satoh and Omura (1981) obtained numerous N-methyl-N-nitrosourea (MNU)-induced endosperm mutant lines. Subsequently, mutants in the starch (Yano et al. 1985), sugar (Yano et al. 1984, Matsuo et al. 1987a) and oil (Matsuo et al. 1987b) content, as well as in the protein bodies (Kumamaru et al. 1988, Ogawa et al. 1989) have been selected from among MNU-induced mutant lines. These results suggest the possibility that mutants with altered levels of certain amino acids can be induced by treatment with MNU.

In this report, we describe the results of selecting mutants for two amino acids, the characterization of the various protein fractions and a genetic analysis.

### Materials and Methods

**Plant materials:** About 360 endosperm mutant lines of rice (*Oryza sativa* L.) were induced by MNU treatment of fertilized eggs from the cultivars, 'Kinmaze' and 'Taichung 65'.

The endosperm mutant line 'EM-317' was crossed with the original variety 'Kinmaze'. The amino acids of the F<sub>2</sub> seeds, one polished grain at a time, were analysed by high-performance liquid chromatography (HPLC).

**Analysis by high-performance liquid chromatography (HPLC):** Rice grains of each line were polished and milled and the powder was then screened through a 60-mesh sieve. Twenty milligrams of milled rice powder was dried under a vacuum in the reaction vial and hydrolysed by 6 M HCl at 110°C for 22 h. Two millilitres of the diluting solution for amino acid analysis (Wako Pure Chemical Co., Osaka, Japan) was added and the mixture was filtered (0.45 µm filter). The resultant filtrate was subjected to amino acid analysis using a Waters HPLC system (Waters Associates, Milford, MA, USA), which consisted of a model 510 pump, a WISP 712 automatic sample processor, a model 680 automatic gradient controller, a model M740 data module, a model 420 fluorescence detector, a column-temperature control module, a column-heater module (62°C) and a column for amino acid analysis (4.6 × 250 mm).

**Extraction of protein:** The albumin/globulin, prolamin and glutelin fractions were extracted from rice powder according to Kumamaru et al. (1988). The protein content of each protein fraction, dissolved in sodium hydroxide, was determined by Lowry's method (Lowry et al. 1951) with bovine serum albumin as the standard.

Total protein extracted with 3 M urea, 1% sodium dodecyl sulfate (SDS) and 0.02% 2-mercaptoethanol was quantified directly in each extract by use of the bicinchoninic acid (BCA) protein assay reagent (Pierce Chemical Co., Rockford, IL, USA).

### Results

'Kinmaze' and 'Taichung 65' showed almost identical amino acid compositions by HPLC. The lysine content of 10 lines among the mutant lines examined was higher than that of the original cultivars. The lysine content of the high-lysine mutants ranged from 5.10% to 6.38%, while those of 'Kinmaze' and 'Taichung 65' were 4.23% and 4.01%, respectively. The histidine content of the high-lysine lines was also increased. The histidine content of the mutants ranged from 3.77% to 4.38%, in contrast to 1.03% in 'Kinmaze' and 1.21% in 'Taichung 65' (Table 1). The relationship between high lysine and high histidine has not been elucidated.

## Correlation between activities of starch debranching enzyme and $\alpha$ -polyglucan structure in endosperms of *sugary-1* mutants of rice

Yasunori Nakamura<sup>1,\*</sup>, Akiko Kubo<sup>2</sup>, Tomoyuki Shimamune<sup>3</sup>, Toshiaki Matsuda<sup>3</sup>, Kyuya Harada<sup>2</sup> and Hikaru Satoh<sup>4</sup>

<sup>1</sup>National Institute of Agrobiological Resources, Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan,

<sup>2</sup>Department of Horticulture, Chiba University, Matsudo, Chiba 271, Japan,

<sup>3</sup>Department of Agriculture, Ibaraki University, Ami, Tsuchiura, Ibaraki 300-03, Japan, and

<sup>4</sup>Faculty of Agriculture, Kyushu University, Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka 812, Japan

### Summary

The biochemical lesion of the *sugary-1* mutation was examined in five different mutants of rice with varying phenotypes but with mutations at the same locus. The cells in the inner part of the endosperm of all mutants tested contained phytoglycogen instead of starch, while the cells located in the outer part of the endosperm tissue from some mutants were filled with numerous starch granules. The molecular size of phytoglycogen was markedly smaller than that of amylopectin as measured by Sephacryl S-1000 chromatography. Analysis of the distribution of  $\alpha$ -1,4 chain lengths revealed that in phytoglycogen the number of A-chains dramatically increased, while long B chains with DP  $\geq$  37 remarkably decreased or were almost absent, which resulted in the disappearance of the cluster structure. The results suggest that changes in the balance of enzymic activities induced by the mutations brought about a drastic alteration in polyglucan structure and the shape of the polyglucan granule. The greater the extent of phytoglycogen regions in *su1* endosperm tissues became, the greater was the phytoglycogen content, and the greater the reduction in the activity of starch debranching enzyme, a type of enzyme referred to as R-enzyme (RE), limit dextrinase or pullulanase. Immunoblot analysis showed that the reduction in RE activity was due to a decrease in the amount of RE protein, and that the reduction in RE was specific since proteins of starch-branching enzymes I and IIa and ADP-glucose pyrophosphorylase were not markedly affected by *su1* mutations. The proportion of starch region to the whole endosperm

tissue of various *su1* mutants was correlated with the RE activity in these endosperms. The results strongly suggest that the reduction in RE activity is involved in the *su1* phenotype and that the enzyme plays an essential role in determining the fine structure of the amylopectin molecule.

### Introduction

$\alpha$ -1,6-glucosidic bonds in amylopectin, a major constituent of starch in a variety of plant tissues, are formed by starch-branching enzyme (BE) (EC 2.4.1.18). It is widely accepted that amylopectin is synthesized by the combined actions of BE and starch synthase (EC 2.4.1.21) which catalyzes the  $\alpha$ -1,4 chain elongation reaction. However, recent studies with *sugary-1* (*su1*) mutants of maize (James *et al.*, 1995; Pan and Nelson, 1984) and rice (Nakamura *et al.*, 1992b, 1996b), all show that amylopectin is replaced by phytoglycogen with more highly branched, water-soluble polysaccharide, strongly suggest that starch-debranching enzymes also play an essential role in determining amylopectin fine structure, since the activities of two types of starch-debranching enzymes, i.e. RE (EC 3.2.1.41) and isoamylase (EC 3.2.1.68), were selectively reduced in the *su1* mutants.

The biochemical lesion of the *su1* mutation has been reported by several laboratories (Nakamura, 1996). Pan and Nelson (1984) showed that the *su1* endosperm lacks the enzyme activity of one of the three isoforms of RE and possesses low activities of the other two RE isoforms. They also reported that the  $K_m$  values for phytoglycogen for the latter two forms are three-fold higher in the mutant than those in the parent cultivar. These results demonstrate the combined effects of the loss or lowering of RE activities and the poor affinity for phytoglycogen in *su1* endosperm. It is not clear, however, whether the effects are specific to RE activities or not, because they did not assay the other enzymes involved in starch metabolism. Later, Dohler *et al.* (1993) reported that the activities of the total amylase and  $\alpha$ -amylase as well as of RE are lower in *su1* kernels of maize than in normal cultivars.

Nakamura *et al.* (1992b, 1996b) assayed the major enzymes of starch and sucrose metabolism in developing endosperms from *su1* mutants of rice and showed that the activity of RE specifically decreases in all *su1* mutants tested. The activities of starch-branching enzyme I (BEI), a major constituent of BE isozymes in rice endosperm

Received 4 September 1996; revised 28 February 1997; accepted 5 March 1997.

\*For correspondence (fax +81 298 38 8347).



## A Conjugative Linear Plasmid in *Streptomyces laurentii* ATCC31255

Chizuru KINOSHITA-IRAMINA, Maki KITAHARA, Katsumi DOI, and Seiya OGATA<sup>†</sup>

Microbial Genetics Division, Institute of Genetic Resources, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka 812–81, Japan

Received December 24, 1996

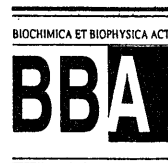
Plasmid pSLL of *Streptomyces laurentii* ATCC31255 (wild-type strain P0) is a 93-kilobase linear DNA plasmid that carries a protein bound to each 5' end of the DNA. It was self-transmitted to the pSLL-cured strain by conjugation in solid culture. The pSLL-cured strain carried a circular plasmid, pSLS, and showed a marked decrease in spore formation and thioestrepton productivity, owing to the pSLS. However, by retransmission of pSLL, these things reverted to levels seen in strain P0. Thus, plasmid pSLL suppressed the injurious effects of pSLS on the host mycelia.

**Key words:** *Streptomyces*; linear plasmid; conjugative plasmid



ELSEVIER

Biochimica et Biophysica Acta 1353 (1997) 103–106



Short sequence-paper

## Cloning and sequencing of the *hup* gene encoding the histone-like protein HSI of *Streptomyces lividans*<sup>1</sup>

Eiji Yokoyama, Katsumi Doi, Seiya Ogata \*

Institute of Genetic Resources, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Higashi-ku, Fukuoka 812-81, Japan

Received 20 March 1997; revised 29 April 1997; accepted 5 May 1997

---

### Abstract

The *hup* gene encoding the histone-like HU-type protein HSI of *Streptomyces lividans* TK24 was cloned and sequenced. The deduced N-terminal amino acid sequence, molecular mass (9851 Da) and pI (9.95) are in good agreement with characteristics of the HSI protein. The *hup* transcript of about 500 nucleotides was detected. The 2.3-kb *HincII* fragment containing the *hup* gene hybridized with the *AseI* fragment C in the 9–10 o'clock region of the chromosome of *S. lividans* ZX7. © 1997 Elsevier Science B.V.

**Keywords:** Histone-like protein; HU-type protein; *hup* gene; (*Streptomyces lividans*)

---



ELSEVIER

FEMS Microbiology Ecology 24 (1997) 41–48

FEMS  
MICROBIOLOGY  
ECOLOGY

## Microbial participation in the formation of siliceous deposits from geothermal water and analysis of the extremely thermophilic bacterial community

Fumio Inagaki <sup>a</sup>, Shu Hayashi <sup>b</sup>, Katsumi Doi <sup>a</sup>, Yoshinobu Motomura <sup>c</sup>,  
Eiji Izawa <sup>b</sup>, Seiya Ogata <sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Microbial Genetics Division, Institute of Genetic Resources, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Fukuoka 812-81, Japan

<sup>b</sup> Department of Mining, Faculty of Engineering, Kyushu University, Fukuoka 812-81, Japan

<sup>c</sup> Department of Earth and Planetary Sciences, Kyushu University, Higashi-ku, Fukuoka 812-81, Japan

Received 27 February 1997; revised 20 May 1997; accepted 21 May 1997

---

### Abstract

Numerous rod-shaped bacterial cells were present in amorphous silica which had formed on the copper plate placed in geothermal hot water, under conditions of pH 7.2 and  $85 \pm 2^\circ\text{C}$ . Bulk genomic DNA in the siliceous deposit was extracted, using lysozymes and the freeze-thaw method. The volume of siliceous deposit formed on one copper plate and the amount of genomic DNA extracted from siliceous deposits exponentially increased with the time of incubation. The phylogenetic diversity in these DNA extracts was investigated by cloning and sequencing of partial 16S rRNA genes obtained by PCR. The bacterial community was composed mainly of three phylogenetic types in domain Bacteria. Cluster I (8 clones) was affiliated with the Aquificales and cluster II (15 clones) was closely related to the genus *Thermus*. Cluster III (2 clones), the sequences of which were homologous with Gram-positive anaerobic thermophilic bacteria, was also detected. These extremely thermophilic bacteria may possibly contribute to the rapid aggregation of amorphous silica.

**Keywords:** Siliceous deposit; Extremely thermophilic bacterium; 16S rDNA; Bio-deposition

## **Histone-like protein of *Streptomyces lividans***

**Eiji Yokoyama, Katsumi Doi, Makoto Kimura <sup>a</sup>,  
Satoru Kuhara <sup>b</sup> and Seiya Ogata**

Institute of Genetic Resources, <sup>a</sup> Department of Agricultural Chemistry, <sup>b</sup>  
Department of Genetic Resources Technology, Faculty of Agriculture,  
Kyushu University, Higashi-ku, Fukuoka 812-8581, Japan  
(Received November 26, 1997 and accepted December 3, 1997)

A DNA-binding protein (about 10 kDa and pI > 9.7) of *Streptomyces lividans* TK24 was purified on a denatured DNA-Cellulose column, and then on a native DNA-Cellulose column. The N-terminal amino acid sequence of this protein had high homology with those of small basic DNA-binding proteins known as histone-like proteins. Thus, this protein was designated HSI (histone-like protein of *S. lividans*). Gel retardation assay revealed that HSI bound with the single-stranded DNA as replication intermediates of pSA1.1. We propose that HSI may participated in the replication of pSA1.1.

The *hup* gene encoding HSI was cloned and sequenced. The deduced N-terminal amino acid sequence, molecular mass (9851 Da) and pI (9.95) were in good agreement with characteristics of HSI. HSI had the signature sequence for the histone-like proteins. Phylogenetic analysis suggested that HSI did not belong to the cluster of histone-like proteins from most of bacteria. The *hup* transcript of about 500 nucleotides was detected. The *hup* fragment hybridized with the *AseI* fragment C in the 9–10 o'clock region of the chromosome. Total DNAs of many *Streptomyces* species hybridized with the internal region of *hup*.

### 3. 総説等要旨

#### 家蚕遺伝子開発分野

日蚕雑 66 (4), 233-241 (1997)  
J. Seric. Sci. Jpn

#### 総 説

## カイコ卵母細胞と精母細胞染色体を用いた Fluorescence *in situ* hybridization 法

土田 耕三<sup>1)</sup>・伴野 豊<sup>2)</sup>・橋戸 和夫<sup>1)</sup>

1) 国立感染症研究所 (旧国立予防衛生研究所)

2) 九州大学農学部

(1997年6月30日 受理)

KO-ZO TSUCHIDA, YUTAKA BANNO and KAZUO HASHIDO: Methods for fluorescence *in situ* hybridization using oocyte and spermatocyte chromosomes of *Bombyx mori*

(1) National Institute of Infectious Diseases, Shinjuku, Tokyo 162,

(2) Faculty of Agriculture, Kyushu University, Higashi-ku, Fukuoka 812

Key word: silk worm, FISH, gene mapping

#### はじめに

特定の遺伝子が染色体上のどこにあるのかを知るマッピングは重要であり、Fluorescence *in situ* hybridization (FISH)は、座位を直接観察できる点で優れた方法である。カイコの染色体でFISHを行った報告は、テロメア (OKAZAKI *et al.* 1993)、欠失型 nonLTR レトロトランスポゾン (OGURA *et al.* 1994)、リボゾーム DNA (TSUCHIDA *et al.* 1995) と TRAS1 (OKAZAKI *et al.* 1995) などに限られている。これらの遺伝子の座位を、目で直接染色体上に観察できたことは、多くの情報を提供し、貴重なものである。しかしながら、カイコの染色体は28種類あり、それぞれを区別して観察することが困難であったためにFISHによってマッピングしても、その結果染色体を特定する事が出来ず、またFISHを行える遺伝子の数も限られていたために、連関を示すことはできなかった。

卵母細胞の減数分裂時におけるパキテン期の染色

体は、その長さによって28本を区別できるとの報告 (KAWAMURA & NIINO 1991, KAWAMURA *et al.* 1994)、ならびにFISHのプロープになり得る遺伝子の数も飛躍的に増加していることから、FISHは今後、カイコの染色体研究において重要かつ便利な実験方法になっていくことが考えられる。本報告では、カイコの染色体を用いて、はじめてFISHを行う研究者を念頭に、染色体標本 (スライドグラス) 作製とFISHを簡便におこなえる方法を述べる。

#### FISH法の概観

染色体上の特定のDNAシーケンスを蛍光物質をつけたプロープで検出するために、プロープDNAを作製する。プロープDNAは、ビオチンやジゴキシゲニンなどのレポーター分子でラベルした後、核内の浸透を考慮して適当な制限酵素を用いて小さなフラグメントに切断し、Denatureをする。標的になる染色体は、スライドグラス上に固定し、Denatureをする。プロープDNAをスライドグラス上にのせて、プロープDNAと染色体とのDNAシー

## 実験テーマ

カイコの胚発生と分化に及ぼす宇宙放射線の影響

## 実験研究者、所属機関

古澤 壽治<sup>\*1</sup>、小谷 英治<sup>\*1</sup>、一田 昌利<sup>\*1</sup>、杉村 順夫<sup>\*1</sup>、渡邊 隆夫<sup>\*1</sup>、  
池永 満生<sup>\*2</sup>、坂口文吾<sup>\*3</sup>、藤井 博<sup>\*4</sup>

\*1 京都工芸繊維大学・繊維学部 \*2 京都大学・放射線生物研究センター  
\*3 福岡市 \*4 九州大学・遺伝子資源開発センター

## 目的

宇宙環境の昆虫に対する生理学的、遺伝学的影響に関しては、ナナフシの胚 (Bucher ら、1986 年) やショウジョウバエ (池永ら、1994 年) を材料とした実験がある。いずれの実験でも宇宙放射線に被曝した胚や生殖細胞では、その後の発生過程で奇形や突然変異を生じる割合が増加すると報告され、これは宇宙放射線と微小重力の相乗効果に因ると考えられている。今回の実験では、遺伝学的、生理学的に最も研究が進んでいる昆虫の一つであるカイコの胚を用いて、微小重力下における宇宙放射線の影響を胚発育、孵化後の成長・発育、奇形発生の角度から検討する。

## カイコの新突然変異，眼紋赤“ro”の遺伝

西川和弘・石原大輔・西坂章文・坪和和彦

国分次雄・藤井 博

九州大学農学部

カイコの眼紋に関する突然変異は、*bl* (眼紋全黒)、*E<sup>M</sup>* (ちよび髭)、*les* (light eye spot) などが知られているが、眼紋の色素に関する突然変異は報告されていない。我々は1985年に眼紋が赤色の新突然変異を見つけたのでその遺伝様式について報告する。

**材料と方法** 供試した系統は九大農学部保存の *i50* 系統である。本系統は、1985年に *E71* 系統から眼紋が赤色をしたカイコに由来する。このカイコは従来の眼紋が赤みのある系統とは異なり鮮やかな赤色の眼状紋をしていた。これを赤系として相互交配を行ったところ、常に眼紋赤を分離した。これを1987年に *i50* 系統 (眼紋赤系統) として継代してきた。この眼紋赤形質を支配する遺伝子の連関検索を行った。

**結果と考察** *i50* 系統の眼紋赤形質を支配する遺伝子、眼紋赤にちなみ英名をルーージュとし、略して *ro* を設定して連関検索を行った。連関検索を行うために *i50* 系統 ( $p^3$ , *ro*) に種々の標識遺伝子系統を交配した。種々の交配の一つに交雑  $F_1$  個体が正常色 (+) と *ro* 個体に分離した。それぞれを別々に上殖したところ、+ 個体は全て雄蛾であり、*ro* 個体は全て雌蛾であった。このことから *ro* は伴性遺伝をすると予想される。

そこでこのことを確かめるために、*A01* 系統 ( $p^3$ , *ro*) と眼紋が正常色の *i40* 系統 ( $p^4$ , +) の正逆交配を行った。まず *A01* 系統 ( $p^3$ , *ro*) の雌と眼紋が正常色の *i40*

系統 ( $p^4$ , +) の雄とを交配した。その交雑  $F_1$  幼虫は304個体全てが正常色であった。すなわち雄、雌ともに眼紋は全て正常色であった。そこで  $F_1$  相互の交配を行い、交雑  $F_2$  幼虫の分離を見ると、眼紋黒が215個体と *ro* 個体が70であった。それぞれについて雌雄鑑別を行ったところ、眼紋黒は73個体の雌と142個体の雄とを含んでいた。*ro* 個体は70個体全てが雌であった。

一方、逆の交配、すなわち眼紋が正常色の *i40* 系統 ( $p^4$ , +) 雌に *A01* 系統 ( $p^3$ , *ro*) 雄を交配した場合、その交雑  $F_1$  幼虫の眼紋は、赤色が89頭と正常色が130頭とほぼ1:1に分離した。さらに上殖後、蛹の雌雄鑑別を行ったところ、眼紋赤の個体は全て雌であり、正常色個体は全て雄であった。次いで交雑  $F_1$  の眼紋赤雌に眼紋正常色雄を交配し、後代を調べた。その結果、眼紋正常色個体が160頭、*ro* 個体が122頭とほぼ1:1で分離した。さらに正常色の160頭を上殖した後、雌雄鑑別をおこなったところ、雄が65頭、雌が57頭と、1:1に分離した。同様に *ro* 個体の場合、雄が88頭、雌が72頭と、雄と雌とが1:1に分離した。

以上の結果から、*ro* 遺伝子は単純劣性遺伝子でZ染色体に座することが明らかである。

**要結** 眼紋の色に関する新突然変異、眼紋赤“ro”の遺伝様式を調べた結果、*ro* 遺伝子は単純劣性遺伝子に支配され、Z染色体に座することが明らかとなった。

## カイコ絹糸腺エステラーゼの発育に伴う 変動とその性質

大城戸利久・藤井 博

九州大学農学部

カイコ幼虫の絹糸腺は機能的に異なった前部・中部・後部糸腺から構成される特異的に分化した組織である。絹糸腺のエステラーゼは吉武ら(1966)によって遺伝学的研究は行われているものの、生理機能は不明である。そこでエステラーゼの生理機能を解明する一環として今回は native-PAGE を用いて絹糸腺エステラーゼの発育に伴う活性および成分の変化を調べ、次いで各種阻害剤との反応によりエステラーゼ成分の性質の違いを調べた。

**材料と方法** 供試蚕は九州大学農学部保存の n51 系統である。幼虫から絹糸腺を取り出し、組織重当たり一定量の緩衝液 (0.1% chaps-0.1M リン酸バッファー pH 7.0) で磨砕後、遠心 (10,000g×30分) し、その上清を粗酵素液とした。電気泳動と活性染色およびエステラーゼ活性の測定は大城戸ら (1993) の方法に従った。阻害剤との反応は粗酵素液と阻害剤を混合し、30℃で20分間保温後、電気泳動を行い、各成分の活性への影響を調べた。

**結果と考察** 5 齢 3 日の絹糸腺全体には雌雄共に合計 5 本の活性帯が検出された。吉武らが報告した 2 つのエステラーゼ成分 Ses よりも多くのエステラーゼが認められた。移動度の速い順に Sest 1~5 (Silk gland esterase) と名付ける。活性帯には濃淡が見られた。Sest 4 が最も濃く、次いで Sest 2 が濃く、Sest 1, 3, 5 はほぼ同程度であった。次に前, 中, 後部の Sest 成分を調べた。前部と中部では全ての成分が検出され、後部では Sest 1~4 は検出されたが、Sest 5 は検出されなかった。絹糸腺の部位によって Sest 成分に違いが認められ、特に Sest 1~4 は絹糸腺内で構成的な働きを持つのではないかと考えられる。さらに各部位における単位粗抽出液当たりの酵素活性を調べた。前部は 100  $\mu$ l 当たり 67U, 中部は 28U, 後部は 11U だった。また前・中・後部の全エステラーゼ活性はそれぞれ 40U, 550U, 210U だった。これらの結果から前部は他の部位よりも Sest が多く存在すると思われる、前部糸腺におけるエステラーゼの機能の解明の糸口になると考えられる。

次いで発育過程における Sest の活性・発現パターンを調べた。4 齢起蚕では Sest 3, 4, 5 が検出され、Sest 3 と 5 は 4~5 齢期間中殆ど変化なく、吐糸 1 日にも活性帯は検出された。Sest 4 は 4 齢 0 日から徐々に濃くなり、4 日には急激に濃くなった後、吐糸 1 日には消失した。一方、Sest 1 と 2 は 5 齢起蚕から検出され始め、3 日で急激に活性帯が濃くなった後、吐糸 1 日には共に消失した。全活性は 4 齢起蚕から 5 齢 2 日までは徐々に活性は上昇し、絹糸腺内のタンパク質合成が盛んになる 4 日に 1,360U に増大し、吐糸 1 日に 400U となった。これらの結果から、Sest 1, 2, 4 が絹糸腺のタンパク質合成活動と何らかの関与が考えられ、Sest 3, 5 はそれには余り関与しないと考えられる。

Sest の性質の相違を調べるために各酵素と 6 種類の阻害剤 (パラオクソン, DFP, エゼリン, PMSF,  $\rho$ CMB, EDTA) との反応性を調べた。まず、パラオクソンでは  $10^{-11}$ M では全ての活性帯が消失した。DFP では  $10^{-7}$ M では Sest 1, 2 が消失し、Sest 4 は  $10^{-4}$ M で消失した。エゼリン, PMSF,  $\rho$ CMB, EDTA に対してはパラオクソンと DFP より高濃度においても各成分の活性帯に影響は見られなかった。この結果 Sest は有機リン剤に対して感受性が高く、また DFP に対する感受性に違いが見られたことから Sest の性質の違いがあるのではないかと考えられる。

**要結** 絹糸腺中に 5 つの Sest を見出した。発育に伴う活性の変化から、Sest 1, 2, 4 の変化は絹糸腺のタンパク質合成活動と一致していたことから 5 齢後期の活発なタンパク質合成に関与する可能性が考えられる。また Sest は有機リン剤に最も阻害される特性であった。

### 文 献

- 1) 吉武成美・江口正治・土屋洋子 (1966) : 日蚕雑, 35, 331-335.
- 2) 大城戸利久・新井 仁・藤井 博・土井良 宏 (1993) : 九州蚕糸, 24, 42.

## 遺伝的モザイク系統を用いた不眠死油 (*onl*) の解析

後藤 弘・伴野 豊・河口 豊・古賀克己

宮崎県総合農業試験場  
九州大学農学部

不眠死油 *onl* は幼虫皮膚が高度な油蛋白のみならず致死性をも現し、大半の個体は1齢期に斃死する(後藤ら, 1994)。*onl* 個体では体液中の尿酸濃度が正常に比べ2倍と高く、さらに致死前になるとその濃度は10倍にも達することが明かにされている。今回は *onl* の形質発現を明らかにする一環として遺伝的モザイク (*mo*) 系統を利用して同一個体内に *onl*/+ と *onl/onl* の遺伝子構成からなる細胞とを併せ持つ個体を作成し、致死性の発現に着目して実験を行った。

**材料と方法** 供試系統は九州大学農学部保存の不眠死油 (*onl*) 系統 a50 と遺伝的モザイク (*mo*) 系統 mo 42 である(土井良ら, 1992)。mo 42 系統の雌に a50 系統に分離した *onl* 個体のうち成虫にまで達した *onl* ホモの雄を交配させ、以後、sib cross を重ねた交雑 F<sub>3</sub> 区で *onl* 遺伝子に関してモザイクとなった個体を得た。

**結果と考察** a50 系統は第4褐卵 (*b-f*) 遺伝子を持つので、モザイク性の発現を卵色で判別することが可能であった。モザイク卵は F<sub>3</sub> の20蛾区中2区において出現した。この2区から幼虫の皮膚が油蛋白部分と正常部分とを併せ持つモザイク個体が11頭出現した。これらのモザイク個体の死亡時期を調査したところ、11頭中1齢幼虫で致死する個体は1頭も出現せず、その斃死時期と頭数は2齢期で1個体、4齢期で8個体、5齢期で2個体であった。*onl* ホモ個体での致死時期は70%が1齢期であり、2齢期では15%と大部分が稚蚕期に斃死していたのに対して(後藤ら, 1994)、モザイク個体では *onl* ホモ個体に比べ致死時期が遅延した。モザイク個体における致死性の発現と致死時期の遅延に関しては次のようなことが想定される。一般に遺伝子の発現は細胞単位で起こり、その作用が細胞外にまでおよび1個体全体を制御する場合と細胞内のみにとどまる場合とがある。今回のモザイク個体の場合、*onl/onl* 細胞のもつ致死性の発

現と *onl*/+ 細胞のもつ非致死性のそれとがそれぞれ細胞内にとどまるならば、*onl/onl* 側すなわち油蛋白部分の発育が遅れ致死性が現われる。一方、*onl*/+ 側は正常に発育することになり、モザイク個体の幼虫体形は左右で非対称となり、最終的には死に至ると考えられる。これに対し、致死性と非致死性とは個体全体に及ぶ場合にはどちらの作用が上位になるかによって個体の発育が決定されることになる。実際に孵化してきた個体の致死時期は遅延し、また幼虫個体は油蛋白と正常部分とで大きさが異なることはなく左右対称であった。この結果からすると致死性は細胞の遺伝子型に依存して部分的に発現されるのではなく、*onl/onl* の遺伝子構成からなる細胞のもつ致死性と *onl*/+ の遺伝子構成からなる細胞の非致死性とは個体内で互いに影響し合っていると判断される。しかもモザイク個体がすべて幼虫期において斃死してしまったことからすると *onl/onl* 個体の細胞のもつ致死性が *onl*/+ の細胞の非致死性に対し上位に支配していると言える。しかし、*onl* ホモ個体の場合に比べモザイク個体では致死時期が遅延することから、正常側部位の存在が油蛋白側の致死性に影響を与えており、致死性の上位性は完全ではないと考えられる。

**要結** 遺伝的モザイクを用い、*onl/onl* と *onl*/+ の遺伝子構成を持つ細胞を同一個体に共存させると *onl/onl* 細胞の致死性が *onl*/+ 細胞にもおよぶことが判明した。

### 文 献

- 1) 土井良 宏・藤井 博・河口 豊・木原 始・伴野 豊 (1994)：家蚕遺伝子資源系統の特性情報，九州大学農学部，pp 73.
- 2) 後藤 弘・伴野 豊・河口 豊・古賀克己・土井良 宏 (1994)：九州蚕糸，25，48.



## 福岡産クワコの休眠ホルモン—PBAN 遺伝子 第4イントロンの塩基配列

白尾 吏・伴野 豊・中村 隆・河口 豊・古賀克己

九州大学農学部

クワコ (*Bombyx mandarina*) はカイコ (*Bombyx mori*) の祖先種であると考えられているが、両者の関係を塩基配列のレベルで調査した報告は数少ない。今回、福岡県と長崎県とから採取したクワコについて、休眠ホルモン—PBAN 遺伝子の第4イントロンの塩基配列を解析し、カイコの既知塩基配列と比較した。その結果、生息地の異なるクワコ間での塩基配列の相同性は高く、カイコのそれらとは異なる構成であることが判明した。

**材料と方法** 供試したクワコは福岡県糸島郡、福岡市東区奈多および長崎県対馬から採取した。ゲノム DNA は終齢幼虫の後部絹糸腺よりフェノール法によって抽出した。PCR に用いたプライマーは Pinyarat *et al.*: (1995) を参考にして、DH1: 5'-CTACGCCAGCTGACCAGGA-3', DH2: 5'-ATTCTTCGGGGTCAGGTTG-3' とした。PCR の条件は Shimada *et al.* (1995) に従い、変性は90℃60秒、アニーリングは50℃90秒、伸長反応は72℃120秒とし、温度周期は40回とした。PCR 産物をフェノール・クロロフォルム処理した後、エタノール沈殿を行い、10  $\mu$ l の TE に溶解した。得られたインサートは pMOSBlue T-vector kit RPN 1719 によりライゲーションを行い、さらに大腸菌に導入した。得られた形質転換菌を少量培養した後、QIAGEN を用いてプラスミドを精製した。調製した DNA は島津自動蛍光式 DNA シークエンサー DSQ-1000L で解析した。

**結果と考察** PCR 産物をアガロースゲル電気泳動で分析したところ、3地域のクワコは約740bpのDNA断片が検出された。次にこれら PCR 産物は T ベクターにライゲーション後、塩基配列の決定を行った。総塩基数は糸島産と対馬産のクワコでは746bp、奈多産のクワコは744bpであった。各々の地域間での比較を行った結果、糸島産のクワコを基準とすると、奈多産のクワコでは欠失が3bp、挿入は1bp、置換は5bpであり、対馬産のクワコは欠失が1bp、挿入が1bp、置換は5bpであった。隣接する2bp以上が連続して欠失、挿入、

置換が生じた箇所は見られなかった。イントロン部分での比較であることからこの3地域のクワコは相同性が高いと判断した。

ところで、休眠ホルモン—PBAN 遺伝子は既に2系統のカイコ (東海×朝日, w30) で、塩基配列が解析されている (嶋田ら, 1995)。両系統間の最も大きな違いは、w30には東海×朝日にはみられない連続した46bpの配列が存在する点であり、この配列をもつ遺伝子は  $Dh^B$  とされている。3地域のクワコには、カイコ w30と同じ46bpの配列が存在することに加え総塩基数が類似することから、w30に近い配列型であるといえる。そこで3地域のクワコのうち糸島産のクワコを基準にカイコ w30との配列を比較したところ、欠失が10bp、挿入が3bp、置換が30bp認められた。また欠失には2bp、4bpと隣接するものもあった。3地域のクワコ間における比較に比べると、多数の箇所に変異が存在するといえ、カイコとクワコの休眠ホルモン—PBAN 遺伝子は両種の間をみるよい指標になるものと考えられる。

**要結** 福岡県糸島郡、福岡市東区および長崎県対馬より採取したクワコの休眠ホルモン—PBAN 遺伝子第4イントロン部分の塩基配列は極めてよく類似していた。しかし、カイコと同遺伝子部分とを比較すると多くの箇所において配列に相違のあることが判明した。

### 文 献

- 1) Pinyarat W., Shimada T., Xu W., Sato Y., Yamashita O. and Kobayashi M. (1995): Genet. Res. 65, 105-111.
- 2) Shimada T., Kurimoto Y., and Kobayashi M. (1995): Molecular Phylogenetics and Evolution, 4, 223-234.
- 3) 嶋田 透・小林正彦 (1995): 平成6年度科学研究費補助金一般研究(A)研究成果報告書, 代表小林正彦, 138-145.

## クワコの外部形態・染色体・アイソザイムに みられる地理的変異

中村 隆・伴野 豊・河口 豊・古賀克己・河原畑 勇

九州大学農学部

クワコ (*Bombyx mandarina*) は日本および中国大陸、朝鮮半島に広く分布し、染色体数には  $n=27$  (Kawaguchi, 1928) と  $n=28$  (Astaurov *et al.*, 1959) の 2 型がある。一昨年、染色体数の地理的変異を明らかにする研究の一環として対馬に生息するクワコの染色体を観察し、その数を  $n=27$  と報告した (中村ら, 1995)。中国大陸に生息するクワコの染色体数は  $n=28$  であり、日本のそれは  $n=27$  であるとされているものの、両者の分布についての境界はいまだ明らかにされていない。今回私信 (吉武, 1988) では  $n=27$  とされる朝鮮半島に生息するクワコ染色体数の確認を行うと共に、福岡、対馬、韓国ならびに中国の 4 箇所 で採取したクワコについて成虫翅脈、全繭重、アイソザイム多型にみられる形質の変異の面から比較を行った。

材料と方法 分析に供したクワコ個体は福岡県福岡市、長崎県対馬、韓国大邱市、中国浙江省杭州市の 4 地点で採取した。長野県南安曇郡、北海道苫小牧市、中国北京市で採取したクワコについては染色体の観察のみ行った。染色体の観察は幼虫の生殖細胞において中山ら (1986) の方法、翅脈の観察は江崎 (1958) らの方法によって観察した。アイソザイム多型の検出は伴野ら (1993) の方法に従って、ポリアクリルアミド電気泳動を行った後、活性染色あるいはタンパク質染色を行い、それぞれについて変異の解析を行った。

結果と考察 染色体数の確認を行った結果、福岡産、対馬産、長野産、北海道産のクワコではいずれも精原細胞、卵原細胞ともに 54 本の染色体構成であり、減数分裂中期に入った第一精母細胞、第一卵母細胞では 27 本の染色体対合が観察された。一方、中国浙江省産および北京産のクワコでは  $2n=56$ 、減数分裂中期では 28 本であった。また、今回初めて調査をおこなった韓国産は  $2n=54$ 、減数分裂中期では 27 本の染色体構成であり、日本型の染色体構成と同じであることが明らかとなった。

次に生息地を異にするクワコの形態的変異の有無について全繭重と翅脈とに注目して比較を行った。まず雄に関して全繭重を測定したところ、福岡産は 0.49g、対馬産は 0.59g、韓国産 0.40g、中国産 0.24g であった。これらの値は飼育した個体と採取により得た個体に関係なく、また雄のみならず雌においても中国産クワコが最も軽く、他の 3 地域に生息するクワコと明瞭に区別すりこ

とができた。さらに、各地の成虫標本を基に後翅の RS 翅脈と M1 翅脈の融合により生じる有柄 (井上, 1982) の観察を行った。この有柄は昆虫分類上クワコには存在し、カイコにはないされており、クワコの地理的変異を知る指標となると考えたためである。観察したところ、各地域のクワコ全てに有柄は認められその長さに変異がみられた。そこで、カイコにおいても同様の調査を行ったところ、有柄の存在と変異が認められた。したがって、この有柄の形質は分類基準としてふさわしくなく、翅脈から各地のクワコの特徴を論ずるべきではないと判断した。

引き続き、酵素・タンパク質に関する 10 遺伝子座 (アミラーゼ、体液酸性フォスファターゼ、体液エステラーゼ、皮膚エステラーゼ、アリルフォルリン、幼虫型雌特異蛋白質、 $\alpha$ -キモトリプシンインヒビター A 型、B 型、D 型) につき多型分析を行った。その結果、アリルフォルリンおよび  $\alpha$ -キモトリプシンインヒビター A 型を除いた 8 遺伝子座について頻度の差が認められた。それら結果を基に福岡産を基準にして比較すると、対馬産、韓国産、中国産の順に遺伝的な差が拡大することが判明した。

要結 染色体数、全繭重、アイソザイムにおいて地域による差が認められ、福岡産、対馬産、韓国産のグループと中国産に分けられた。さらに韓国産の染色体数が  $n=27$  であることから、 $n=27$  と 28 との分布の境は朝鮮半島の北部付近であると推測された。

### 文 献

- 1) Astaurov, B. L., Golysheva, M. D., and Rovinskaya, I. S. (1959): *Cytology*, 1, 327-332.
- 2) 伴野 豊・柄原真二・河口 豊・土井良 宏 (1993): 日蚕雑, 62, 187-194.
- 3) 江崎佛三ほか (1958): 原色日本蛾類図鑑, (下) 303pp., 保育社.
- 4) 井上 寛 (1982): 日本産蛾類大図鑑, 1, pp 552., 講談社.
- 5) Kawaguchi, E. (1928): *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anai. Bd.*, 7, 519-522.
- 6) 中村 隆・伴野 豊・河口 豊・古賀克己・河原畑 勇 (1995): 九州蚕糸, 26, 37.
- 7) 中山光育・伴野 豊・土井良 宏 (1986): 九州蚕糸, 17, 65.
- 8) 吉武成美 (1988): 家蚕の起源と分化に関する研究序説, 125pp., 東京大学農学部養蚕学研究室.

## カイコとクワコとの間における生殖隔離の程度

中村 隆・伴野 豊・河口 豊

古賀克己・河原畑 勇

九州大学農学部

カイコ (*Bombyx mori*) とクワコ (*Bombyx mandarina*) は別種であるにも関わらず交雑が可能であり、生殖力を持つ雑種後代が形成される。しかし、この矛盾する関係については今までほとんど注目されることがなかった。今回は Mayr (1969) の生殖隔離機構モデルの一段階である雑種形成前の交尾行動過程に着目し、両者間の交尾率に基づいてカイコとクワコとの生殖隔離の程度について検討した。

**材料と方法** クワコは福岡県宗像郡、北海道苫小牧市、中国浙江省杭州市、韓国大邱市で採取した個体を用いた。カイコは九州遺伝子資源開発研究センター保存の p 22, p 33, r 53, a 52 の各系統を供試した。交尾は 30cm × 40cm × 14cm (高さ) と 30cm × 40cm × 7cm (高さ) の 2 種類のプラスチック製のざる籠を重ねた空間内に、羽化当日の雌雄 1 対を入れて行った。その翌日から 24 時間間隔で産卵状況の調査を行い、受精卵が確認された場合に交尾が行われたと判定し、その割合を 1 対の交尾率とした。

**結果と考察** カイコの交尾方法は養蚕の一技術として確立されている。一方、クワコでは飛翔力を有するためこれまで封筒内での袋採り方法 (石原, 1943) が採用されてきた。しかしこの方法を用いた場合、交尾率が 45% (12/25) と低く、本実験にとってふさわしい方法ではなく、改善の必要性があった。そこで天蚕に用いられている籠採り法 (中嶋, 1990) を応用して、市販のプラスチック製のざる籠内で交尾を行わせることを試みた。その結果、交尾率は 89% (42/47) と高くなり、ざる籠採り法がクワコの交尾方法として有効であると認められた。そこでこの方法を用い、カイコとクワコとの組み合わせにおける交尾率の比較を行った。

カイコ同志におけるざる籠内での交尾はクワコ同志の場合と同様に容易であり交尾率は 100% (10/10) であった。一方、種間交雑であるカイコ雌 × クワコ雄の場合では交尾率は 21% (4/18) と低下した。さらに逆交配であるクワコ雌 × カイコ雄では本実験において全く成功例を認めなかった。クワコ雌 × カイコ雄の交尾行動を熟視すると、クワコ雌が歩行力、飛翔力ともにカイコ雄より活発であるために、カイコ雄が交尾を行うために接近すると動き回り、交尾が成立しなかった。しかし、人為的に雌のみを 5℃ の低温処理を数分行い動きを鈍くすると、雄は拒否されず交尾が行われた。また、カイコ同志では交尾後の割愛が必要であったが、クワコ同志、カイコ × クワコおよびその逆交配の 3 組の場合では割愛は必要とせずに交尾が終了した。

以上 4 つの組み合わせにおける結果から、いずれの場合も異なる交尾状況であることは明白であった。カイコとクワコとの組み合わせで交尾率が低下するか、あるいは 0% であったことから、両者間には交尾行動過程において生殖隔離が生じていると推察された。

**要結** クワコの交配法として有効なざる籠採り法を用いて、カイコとクワコ間での交尾率の比較を行った結果、両者間には交尾行動において生殖隔離があると判断した。

### 文 献

- 1) 石原 保 (1943) : 宝塚昆虫館報, 31, 1-22.
- 2) Mayr, E. (1969) : Principle of Systematic Zoology, 428 pp., McGraw-Hill, New York.
- 3) 中嶋福雄 (1990) : 天蚕 (赤井 弘・栗林茂治編), pp. 170-180, サイエンスハウス.

## 福岡市におけるクワコの分布と発生周期

伴野 豊・中村 隆

九州大学農学部

カイコに最も近い野外昆虫であると考えられているクワコは、日本では沖縄を除く各地に広く生息が知られている。しかし、養蚕業の衰微に伴い桑園が減少している中、クワコの生息場所も急激に減少している状況にある。筆者らの九州大学のある福岡市でも都市化が進み、東区の本学箱崎キャンパスにまとまった桑園を残すのみで、クワを見かけることすら稀である。20年ほど前までは、九州大学キャンパス内や市内中央部でもクワコが見られたが害虫駆除に農薬を用いたため、最近では全く見られず、市内でのクワコ生息地発見は困難と思われていた。ところが、1994年5月福岡市内においてクワコの生息地を偶然発見した。今回はその分布と発生周期について報告する。

**結果と考察** クワコの生息が確認された場所は福岡市東区奈多地籍である。最初の発見地では栽培桑が巨木化したと思われる1本の大木を中心に、30本程の実生から自生したと判断されるクワが1キロ四方の林地と宅地の間に散在して確認された。一度に発見できる個体数は2時間余りで全体から10~20頭であった。翌1995年冬にはその場所から1キロ程離れた地点で、1本の立通しの桑に約150個のクワコの繭が作られているのを確認した。これまでの踏査で奈多地籍には約50本のクワを確認している。これらのクワを対象に1994年から1997年の4年間クワコを観察したところ、幼虫は4月下旬から11月上旬まで確認された。幼虫が大きくなり発見が容易になる3齢~終齢幼虫に達した個体が多く見られる時期は5月中

旬、7月中旬、8月下旬、10月上旬であった。これら期間の間隔は40日~60日であり、クワコの1世代に要する日数と一致していることから福岡市では4化性のクワコが生息している可能性が考えられた。しかし、クワコの蛹期間は通常2週間であるものの、大場(1939)によれば最長で136日にもおよぶ個体が報告されている。また、室内育した場合、蛹期の長さから集団は2つに分けられ、2週間前後のグループと30日前後の長いグループが存在することも知られる(谷口・蛭木, 1983)。福岡市の野外から採集した個体でも50日間の蛹期間をもつ個体を見出した。さらには、第3回目の発生である8月下旬に野外から採集した3齢~終齢幼虫が成長し成虫となり産下した卵はほとんどが休眠卵となった。したがって、これらから判断すると福岡市の4化性のクワコが生息する可能性はあるものの3化性が多く、4回の発生ピークがみられるのは蛹期間の日数が個体により大きく異なっているためであると考えられた。

**要結** 福岡市東区奈多にクワコの生息地を発見した。幼虫が確認できる期間は4月下旬から11月上旬であり、この間、5月中旬、7月中旬、8月下旬、10月上旬に3齢~終齢幼虫を多く見出した。

## 文 献

- 1) 大場治男(1939):衣笠蚕報, 396, 115-123.
- 2) 谷口義雄・蛭木 理(1983):蚕糸研究, 126, 18-24.

## カイコ矮小卵遺伝子 *emi* の形質発現、卵形成に およぼす 20-hydroxyecdysone の影響

河口 豊・伴野 豊・古賀克己・土井良 宏

九州大学農学部

カイコの卵サイズに関わる代表的な突然変異としては、遺伝的大卵と小形卵、あるいは矮小卵を挙げることができる(土井良, 1992)。これらのなかでも矮小卵遺伝子は卵サイズを小さくすることのみに作用し、卵黄の形成ならびに受精や孵化(胚子形成)には何ら影響をおよぼさないことが、小形卵突然変異と大きく趣を異にする点である。一方、正常卵産生雌蛹に脱皮ホルモンである20-ヒドロキシエクジソンを大量投与すると卵のサイズが大型化し、遺伝的大卵に匹敵するサイズの大型卵が形成されることが報告されている(河口ら, 1990a; 1990b)。著者らは矮小卵産生雌蛹に20-ヒドロキシエクジソンを投与することにより、矮小卵遺伝子 *emi* の形質発現におよぼす当該ホルモンの影響について解析した。

**材料と方法** 供試材料は九大農学部保存の実験交雑系統 d36 ( $C + / + emi$  ♀ ×  $+ emi / + emi$  ♂) である。化蛹5日の *emi* ホモ雌蛹に20-ヒドロキシエクジソン(SIGMA CHEMICAL CO.; EDと略記する)を1個体当たり  $100 \mu\text{l}/50 \mu\text{g}$  ずつを、対照区には同量の蒸留滅菌水をそれぞれ注射した。成虫化後解剖して卵を取り出し、卵殻が形成された卵を分析試料とした。卵サイズは卵の長径と短径および側面部の面積について調査した。卵重は100粒当たりの重量を測定した。卵黄タンパク質の調製と含量の測定、SDS電気泳動による組成分析については前報(河口ら, 1989, 1990a, 1990b)の方法に準じて行った。

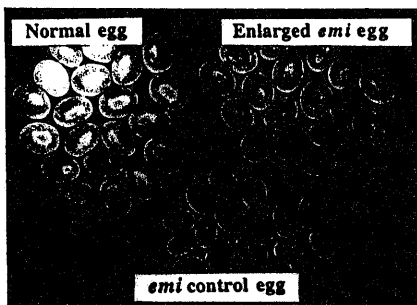
**結果と考察** 卵サイズについては卵の長径、短径ならびに側面積をみると、矮小卵の長径は  $1.15 \pm 0.04\text{mm}$ 、

短径は  $0.85 \pm 0.04\text{mm}$ 、側面積は  $0.77 \pm 0.05\text{mm}^2$  であり、正常卵の  $1.32 \pm 0.07\text{mm}$ 、 $1.09 \pm 0.03\text{mm}$ 、 $1.15 \pm 0.03\text{mm}^2$  に比べいずれも有意に小さくなっていった。EDが投与された矮小卵産生雌蛹で造成された卵のサイズをみると、長径は  $1.33 \pm 0.06\text{mm}$ 、短径は  $1.06 \pm 0.04\text{mm}$ 、側面積は  $1.11 \pm 0.08\text{mm}^2$  であり、矮小卵のそれらよりいずれも有意に大きくなっていった(この卵をED-*emi*大型卵と略記する)。これらは正常卵の長・短径や側面積の値にほぼ匹敵する大きさであった(図)。次に卵重と卵黄タンパク質含量についてみると、それぞれ矮小卵は  $35.6 \pm 1.5\text{mg}/100$  卵、 $29.0 \pm 1.7 \mu\text{g}$ 、正常卵は  $62.3 \pm 0.7\text{mg}/100$  卵、 $52.0 \pm 2.33 \mu\text{g}$  であった。一方、ED-*emi*大型卵では  $50.6 \pm 3.6\text{mg}/100$  卵、 $45.5 \pm 2.0 \mu\text{g}$  であり、矮小卵のそれらよりも有意に増加していた。さらにSDS電気泳動による分析の結果、ED-*emi*大型卵の卵黄タンパク質組成は矮小卵や正常卵のそれと同じであり、相違は全く認められなかった。ED-*emi*大型卵の卵黄タンパク質含量の増加は卵黄を構成するそれぞれの成分の増加によるものであった。矮小卵産生雌蛹に対するEDの投与は卵重と卵黄タンパク質含量の増加をともなって卵サイズの大形化を引き起こした。しかしながら、全ての卵が大型化するわけではなく、ED-*emi*大型卵の出現は卵管中の限られた卵位の卵(1卵管当たり13-16卵)にのみ認められる現象であった。これらの結果は、矮小卵は20-ヒドロキシエクジソン投与によって卵サイズを正常な大ききまで回復(救済)させることができることを明示した。

**要結** 矮小卵産生個体へのED投与による“ED-*emi*大型卵”の形成は *emi* 遺伝子の形質発現の変更が可能であることを意味している。

### 文 献

- 1) 土井良 宏・藤井 博・河口 豊・木原始・伴野 豊 (1992): 家蚕遺伝子資源系統の特性情報—1992—, p 73, 九州大学農学部, 福岡。
- 2) 河口 豊・伴野 豊・土井良 宏・藤井 博(1989): 九州蚕糸, 20, 50。
- 3) 河口 豊・伴野 豊・古賀克己・土井良 宏・藤井 博 (1990a): 九州蚕糸, 21, 47。
- 4) 河口 豊・伴野 豊・古賀克己・土井良 宏・藤井 博 (1990b): 九州蚕糸, 21, 48。



## お米と遺伝子

### 変わりもののお米をつくる (1) アミロースに関する変異

佐藤 光

九州大学農学部附属遺伝子資源研究開発センター・植物遺伝子分野

はじめに

お米の成分、澱粉やタンパク質、脂質はそれぞれ異なる分子を含む複合体であり、また、澱粉はアミロプラストにタンパク質はタンパク質顆粒に、脂質はスフェロソーム(脂肪体)と呼ばれる顆粒に特異的に蓄積されることから、これら米粒成分の種子中での生合成・蓄積には複雑な遺伝子が関与することが推察される。しかし、この分野は米の消費拡大と付加価値の高い新商品の作出をめざし、良食味品種育成や食品工業原料として米品種育成など成分育種の観点から精力的に研究が行われ多くの成果を挙げつつある。トウモロコシでは種子成分に関する多くの変異体遺伝子が見い出されており、これらの変異体遺伝子を用いて種子成分に関する多様な品種を育成することによって、トウモロコシを食糧としてばかりでなく、コーンスターチやコーンシロップあるいはコーンオイルなどの食品化学工業の原料としてトウモロコシの利用拡大に大きく貢献してきた。イネでも在来品種中やガンマー線やX線などの電離放射線や、ある種の化学物質(化学変異原物質)を用いて種子や植物体を処理した後代に、澱粉やタンパク質あるいは脂質など米粒成分に関しトウモロコシに匹敵する多様な変異が見い出され(Satoh、1985、大村・佐藤、1989)それらはわが国の米品種多様化の遺伝子資源として活用されている。米粒成分に関しては多様な変異が認められているが、お米の80%を占める

澱粉の構成成分の一つ、アミロースに関する変異について紹介する。

#### アミロースに関する変異

お米の澱粉はアミロースとアミロペクチンの2種のグルコースポリマーから構成されている。アミロースはD-グルコースが $\alpha$ -1,4結合で直鎖状に繋がったもの、アミロペクチンは直鎖分子が $\alpha$ -1,6結合で別のグルコース鎖に結合した枝別れ構造を持つ分子である。米のアミロース分子は平均重合度が400~1,400程度であるのに対し、アミロペクチンは5,000~20,000と10倍以上大きい巨大分子である(Takeda et al, 1987、檜作、1993)。我々が利用する米はモチとウルチに大別できるが、ウルチ米はアミロースとアミロペクチンの両者を含む澱粉を有するもの、モチ米はアミロースを欠きアミロペクチンのみから構成される澱粉を有するものと一般的には定義される。我々が日常的に食するウルチ米は20%程度のアミロース含有率を持つが、遺伝的にも、また栽培条件によってもかなり変動するため、実際にはウルチ品種内には15%~30%以上までかなりの変異がある。遺伝的な変異としては、在来品種中に自然突然変異としてアミロース含有率の異なる多様な変異が存在し、放射線や化学変異原物質を用いて突然変異誘起処理することによってアミロース含有率を変更するさまざまな変異体が誘発されている。また栽培条件、特に

## 2. サイレージ乳酸菌の機能開発

### —フェージタイピングによる簡便な同定法の開発および高機能サイレージ菌株作出—

土居 克実・江口 智子・田中 治\*・森 勝美\*・大桃 定洋\*・緒方 靖哉

(九州大学農学部附属遺伝子資源開発研究センター, \*農林水産省)

近年の農産物自由化の波は酪農・畜産業に低コスト化を目指したサイレージなどの粗飼料の積極的活用を促している。しかし、西南暖地でのサイレージ調製では高温・多湿が原因となる劣悪発酵が起こりやすく、低栄養価かつ嗜好性の悪い品質のサイレージができてしまう。また、外国産のサイレージ用乳酸菌製剤（スターター）が一般に使用されているが、高温多湿の気候には適していない。

当研究グループは西南暖地型気候に適応したサイレージ乳酸桿菌の開発を目的として、西日本および沖縄地方から NGRI 株80株を分離し、スターターとして利用するための有用特性の検討を行ってきた。また、サイレージ調製に深刻な影響を及ぼすフェージ汚染の西南暖地における現状と、これらの汚染が高温多湿に起因することを明らかにするとともに、フェージ汚染を示すサイレージ評価法を提示し、フェージ汚染の軽減法を考案した。<sup>2)</sup>

本論文ではこれまでに得られた知見を基にして、フ

フェージタイピングを用いたサイレージ乳酸桿菌の簡便な同定法とプラスミド遺伝子を用いたフェージ汚染防止法の開発、さらに乳酸生成経路の遺伝子レベルでの解析を行っている次第について記述する。

#### 1. サイレージ乳酸桿菌のフェージタイピング

サイレージから分離した宿主域が異なる10種のフェージを用いて、16SrRNA シークエンスによって菌種がすでに同定されている NGRI 分離菌株<sup>3)</sup>と基準株および市販サイレージスターターについて宿主域を再検討した。これらのフェージは、*Lactobacillus plantarum* および近縁の *Lactobacillus pentosus* に属する多くの菌株に感染する広い宿主域を示すグループ I、狭い宿主域を示すグループ V、PY3 フェージのように、*L. plantarum* の9株と *L. pentosus* の1株に感染する特異性を示すグループ II、*Lactobacillus casei* と近縁の *Lactobacillus rhamnosus* に属する菌株のみに感染するグループ III、*L. casei* にのみ感染するグループ IV の5グループに分

## 放線菌の接合性プラスミド

土居 克実・横山 英之・緒方 靖哉

*Streptomyces* 属を中心とする放線菌は、原核微生物でありながら、カビ類に匹敵する複雑な形態分化を行う特性や抗生物質をはじめとする多種多様な二次代謝物生産特性を有する生物学上あるいは産業上きわめて重要な菌群である。近年、放線菌の形態分化や二次代謝生産に関する研究は著しい進展を見せている。これらの研究の進展に、*Streptomyces* 属放線菌のプラスミドが、クローニングベクターとして、また接合伝達能や宿主染色体への組み込み能などの特異的な機能によって果たしてきた役割は計りしれない。<sup>1,2)</sup>

本稿では、放線菌プラスミドの特性、遺伝子の構造と機能、複製機構、ベクター化、ポック形成現象などについて、我々の研究室で研究を進めているチオストレプトン生産菌 *S. azureus* の接合性プラスミド pSA1.1 を中心に記述する。

### 1. 放線菌のポック形成現象

*Streptomyces* 属放線菌の接合伝達は、Hopwood らにより、*S. coelicolor* A3(2) を用いて系統的に研究され、これにプラスミド SCP1 と SCP2 が *Escherichia coli* の F 因子に類似の機能で関わっていることが明らかにされた。<sup>3)</sup> また、今日ポック形成現象あるいは“pock”と呼ばれている接合致死 (lethal zygotis) 現象が、SCP1 と SCP2 の関与によって起こることもやはり Hopwood らにより示された。これらの報告は放線菌におけるプラスミドの機能を明示した最初のものである。

ポック形成現象とは、固体培地上で接合機能を有するプラスミドを持つ雄株 (供与菌) を同種プラスミドを持たない雌株 (受容菌) の多量と一緒にプレートすると、雄株のコロニーに接して生育する雌株に気菌糸と胞子形成に阻害が起こり、ポックと呼ばれる円形の生育阻害ゾーンが生じる現象を言う。ゾーン内の多くの細胞にプラスミドが伝播している。<sup>4)</sup> *S. azureus* では、野生型株 ATCC14921 由来の pSA1.1 保有株である PK100 を供与菌に、非保有株 PK100C を受容菌として混合培養を行うと顕著な接合性ポックの形成が起こる。<sup>6)</sup> これらの阻害は下記する *kil-kor* システムの乱れに起因すると考えられる。

### 2. 放線菌の接合性プラスミドの特徴と多様性

現在報告されている放線菌の接合性プラスミドは 2 本

鎖 DNA であり大部分が ccc 形態をとるが、線状 DNA のプラスミドも見いだされている。サイズは 4 kb 以下から 100 kb 以上のものまで広範囲にわたり、コピー数も 1 から数百までのものがある。さらにこれらのプラスミドの中には宿主染色体中への組み込み能を有するものも知られているが、他種菌株では *E. coli* の F 因子以外ではやはり *E. coli* の e14 が知られているくらいであり、組み込み能は放線菌プラスミドのもつ特徴の一つと考えられる。

放線菌の接合性プラスミドはそれらの特性から次の 3 グループ、① *S. lividans* で発見された pIJ101 (8.8 kb) や *S. nigricans* の pSN22 (11.0 kb) のように比較的小サイズで ccc 形態をとるもの、② *S. coelicolor* の SCP1 (350 kb), *S. laurentii* の pSLL (93 kb), *S. rochei* の pSLA2 (17 kb) のように線状の形態をとるもの、③ *S. azureus* の pSA1.1 (9.1 kb), *S. ambofaciens* の pSAM2 (10.9 kb), *S. coelicolor* の SLP1 (17.2 kb) のように自律型の ccc 形態と宿主染色体中への組み込み形態の二形態が取れるものに分類できる。

### 3. プラスミドの接合伝達に関する遺伝子

3.1 菌糸間伝達に関する *tra*, *spi* 放線菌の接合性プラスミドの接合伝達に関わる遺伝子は一般に *tra* と呼ばれる。*E. coli* の F 因子の *tra* 遺伝子群に比べてきわめて少ない遺伝情報量であるにも関わらず、接合伝達は非常に効率的に行われる。これまでに pIJ101, pSN22, pSAM2 などで *tra* の塩基配列が明らかにされている。9131 bp からなる pSA1.1 では、Fig. 1 に示す *spi* が *tra* 機能を有する。*spi* は 1326 bp からなり、胞子形成阻害遺伝子として同定されたが、<sup>7)</sup> その後プラスミドの接合伝達に必須な *tra* 遺伝子であることが明らかになった。<sup>8)</sup> Fig. 2 に示すように、*spi* 遺伝子産物はそのアミノ酸配列上に mononucleotide binding site (MBS) および transmembrane segment (TMS) のコンセンサス配列を持っており、これらのモチーフが接合伝達の際に膜貫通を伴う DNA 転移に機能していると考えられる。*spi* は pSAM2 の *traSA* とは非常に高い相同性が見いだされたが、他の放線菌プラスミドの *tra* とは MBS, TMS 以外の相同性は低い。

3.2 *kil-kor* システムによる遺伝子発現制御 放線菌の接合性プラスミドにはグラム陰性菌の広宿主域プラスミド RK2 で報告された *kil-kor* システムと類似した遺



## 4. 講演要旨

### 家蚕遺伝子開発分野

#### 日本蚕糸学会大会（東京都）4月，1997

カイコNp重い形突然変異体 ( $E^{Np}$ )の細胞遺伝学的研究

○井上恵介・伴野 豊・中村 隆・河口 豊・古賀克己  
・土井良 宏（九大農）

カイコNp重い形突然変異体 ( $E^{Np}$ )は、第5体節、第6体節に半月紋が発現する突然変異体であるが、第6連関群と第20連関群の染色体が関与した染色体異常を伴っていることがこれまでの研究で明らかとなっている。今回、 $E^{Np}$ 個体の染色体異常に関して詳細に観察を行ったところ、第一精母細胞の分裂中期において28本の染色体をもつ細胞を121個、27本の染色体をもつ細胞を93個認めた。これら2種類の染色体数の細胞は形状によりさらにそれぞれ2つに分けられた。その内訳は28本の染色体細胞では一見、正常な形状を呈す染色体構成からなる場合が85個、三価染色体と一価染色体とがそれぞれ1個ずつ一細胞に同時に存在する場合が36個であった。27本の染色体構成からなる細胞では、直線状の4価染色体を含む細胞が57個、固まり状になった4価染色体をもつ細胞が36個であった。引き続いて、雌の $E^{Np}$ 個体の第一卵母細胞分裂中期を観察した。この場合は28本の染色体で構成される細胞が47個観察されたほか、27本の細胞が6個、29本の細胞が12個観察された。現在、これらの異常染色体について、 $E^{Np}$ 遺伝子の近傍の*BmA<sub>ntp</sub>* 遺伝子を鋳型としたRNAプローブを用い、in situ hybridization法で追究している。

## 日本蚕糸学会大会（東京都）4月，1997

カイコ初期胚子cDNAクローンと可視形質遺伝子との連関検索

○甲斐浩臣・藤井 博・原和二郎\*・焼山正敏・土井良 宏

（九大農・\*蚕糸昆虫研）

我々はこれまでに、初期胚子より調製したcDNAをプローブにしてRFLP解析を行ったところp50と日02間で極めて高い効率で多型が検出されることを明らかにした。そこで今回はp50と日02の戻し交雑区におけるこれらプローブの連関分析を行うと共に、一方でこれまでに連関群が明らかにされた可視形質遺伝子で標識したマルチマーカー系統を作成し、これを用いて初期胚子より調製したcDNAをプローブにして連関検索を行った。

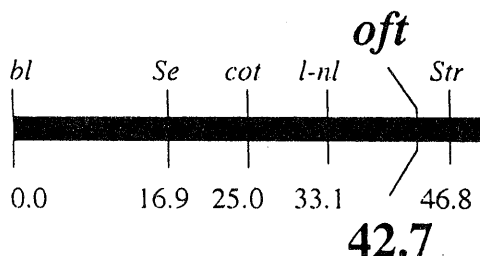
優性形質を有する標識したD01(*Ze, El, Ia, K*), D03(*L, U, Lan*), D05(*SeI, E-tr, Nd*)にp50を戻し交雑した区の個体及び劣性形質で標識したD10(*q, st, bts, oh*), D12(*bl, cts, or tub*), D14(*ch, oy, w-2 so*), D16(*oc, nb, mln*)の各々に劣性ホモ系統を戻し交雑した区よりそれぞれ個体別にゲノムDNAを調製し、cDNAプローブを用いサザン法により連関分析を行った。その結果、プローブNo.53が*q*と、すなわち第7連関群と、さらにNO.96が*oh*と、すなわち第20連関群と連関することが明らかとなった。

## 日本蚕糸学会大会（東京都）4月，1997

カイコにおける新規油蚕突然変異、第15油の遺伝学的研究

○河口 豊・伴野 豊・古賀克己・土井良 宏（九大農）

カイコ保存系統f11の飼育中に油蚕を見出した。遺伝分析を行ったところ劣性の新規自然突然変異であることを認め、第15油(*translucent-15*)と命名し、遺伝子記号を*oft*とした。広範な連関分析の結果、第15連関群に所属することが判明した。次いで、同連関群所属の眼紋全黒遺伝子*bl*と腹白卵遺伝子*Se*とを基準に用いて3点実験を行い、*oft*遺伝子座を第15連関群42.7と決定した。



Genetic map of the fifteenth linkage group of *Bombyx mori*

## 日本蚕糸学会大会（東京都）4月，1997

カイコ体液キモトリプシンインヒビターCI-13遺伝子の構造解析

○ 焼山 正敏・藤井 博・土井良 宏 （九大・農）

カイコ幼虫の体液中に存在するキモトリプシンインヒビター（CI-13）は、第2連関群の23.7に占座する*Ici-A*遺伝子に支配されている。

我々は、既にカイコ幼虫脂肪体cDNAライブラリーよりシグナルペプチド領域を含む258bpのCI-13cDNA遺伝子をクローニングしている。

そこで今回は、このcDNA遺伝子情報を基にしてCI-13遺伝子のゲノム解析を試みた。先ず、カイコ（r06系統）5令3日後部絹糸線よりゲノムDNAを抽出した。このゲノムDNAを用いてCI-13遺伝子翻訳領域のゲノム解析を行い、更に、転写開始上流の解析も行った。その結果、翻訳領域のゲノムサイズは、1.5Kbpで3個のエクソン部から構成され、転写開始上流には、TATA-boxおよびCAAT-boxが存在していることが明らかになった。

## 日本蚕糸学会大会（東京都）4月，1997

白血CBPはカロチノイドを結合できるか

○ 藤井 博・河口 豊・土井良 宏（九大農）

カイコ黄血系統の体液中カロチノイド色素はカロチノイド結合タンパク質（CBP）と結合して、カロチノイドと結合した複合体として存在している。一方白血系統では体液中にはカロチノイドが皆無であるがカロチノイドを結合していないCBPが存在している。ところが、黄血および白血のCBPは共に糖脂質複合タンパク質であり、糖、脂質、タンパク質の成分に殆ど違いが見られない。そこで白血のCBPが果たしてカロチノイドを結合することが出来るのか否かを調べた。

黄血系統の体液から精製したCBP-カロチノイド複合体と、白血系統の体液から精製したCBPを各々Na-デオキシコール酸(Na-DOC)で処理後、Sephadex G-200カラムを用いてタンパク質と脂質、カロチノイドNa-DOCを含むミセルとを分離した。その後、タンパク質と脂質、カロチノイドミセルとを混ぜ、Na-DOCを含むまない緩衝液で透析してNa-DOCを除きCBP-カロチノイド複合体を形成させた。その結果、白血のCBPは黄血のカロチノイドとCBP-カロチノイド複合体を形成した。すなわち白血のCBPは黄血のCBPと同様にカロチノイドを結合する能力を有することが明らかである。

## 日本蚕糸学会大会（東京都）4月，1997

f不眠蚕遺伝子座と第2連関群の起点に関する問題

○伴野 豊・盧 時 甲（慶北大）・土井良 宏・

河口 豊・古賀克己（九大農）

第2連関群の起点である  $p$  遺伝子座近傍にある遺伝子によって支配されることを見出していた f 不眠蚕の遺伝子座を明らかにするため、 $p(0.0)$  と  $Y(25.6)$  とを基準遺伝子に3点実験を行った。 $p^{M+Y}/p^3 nm-f+$  の相互交配区における幼虫分離は  $p^M Y$  1119頭、 $p^{M+103}$  頭、 $p^3+$  22頭、 $p^3 Y$  0頭（6区計）であり、組換え価は  $nm-f-p^M$  間5.22、 $p^M-nm-f$  間29.14、 $nm-f-Y$  間34.41となった。本結果からすると第2連関群の染色体上には起点（0.0）とされる  $p$  遺伝子座の左方に未知の領域があることを示している。これを確認すべく基準遺伝子と交配様式を変え、 $p^{S+Y}/p^3 nm-f+$  の相互交配区と  $p^{M++}/p^3 nm-f+$  と  $p^{S+Y}/p^3 nm-f+$  の交配区において遺伝子分析を行ったところ、両交配区共に  $nm-f$  遺伝子は  $p$  遺伝子座の左方に位置することを支持し、その組換え価はいずれも1.68であった。f不眠蚕は自然突然変異として発見されており受精率・孵化歩合の低下はみられず染色体異常を伴っている可能性は低く第2連関群の起点は変更することが妥当であると考えられる

## 日本蚕糸学会大会（東京都）4月，1997

染色体構成から見た中国産クワコとカイコとの類縁性

○中村 隆・伴野 豊（九大農）・徐 孟 奎（浙江農大）・

中田 徹（北大農）・河口 豊・古賀克己（九大農）

中国産クワコの染色体数は、カイコと等しく、 $2n = 56$ 、 $n = 28$ である。中国産クワコの染色体が数の上だけでなく個々の染色体構成においてもカイコと近縁であるかを明らかにするために、両者の交雑  $F_1$  および  $F_2$  において染色体を観察した。 $F_1$  個体の精原細胞はすべて  $2n = 56$  であり異常はみられなかった。しかし、減数分裂期に入った第一精母細胞の約1割では、単価染色体を含む29本の染色体構成および数は28本であるものの二価染色体に断片化した染色体が付随した異常な染色対構成が認められた。 $F_2$  個体の第一精母細胞では  $F_1$  と同様な異常染色体に加え、巨大な染色体をもつ細胞がみいだされ、中国産クワコとカイコとの雑種では染色体構成に異常を生じる個体が出現することが判明した。

## 植物遺伝子開発分野

日本育種学会 91回講演会 (東京) 1997.4

621 ○大塚礼子<sup>1</sup>・吉井美華<sup>2</sup>・竹本陽子<sup>3</sup>・佐藤光<sup>3</sup>・小川雅広<sup>1</sup> (1.山口県立大家政・2.国税庁醸造研究所・3.九大農) イネ57H変異体に存在する57kDaポリペプチドの小胞体内分布の違い  
OHTSUKA R., M.YOSHII, Y.TAKEMOTO, H.SATOH and M.OGAWA (1.Fac.Home Econ, Yamaguchi P.U., 2.Nat. Res. Inst. of Brewing, 3.Fac. Agri., Kyushu U.) Intracellular distribution of 57kDa polypeptides in 57H mutants of rice (*Oryza sativa* L.)

57kDaポリペプチドを蓄積する特徴を示すイネ57H突然変異は、*esp-2*を除いて正常なプロテインボダイ(PB-IとPB-II)を形成する。これまでに6つの遺伝子座が同定されたが、57kDaポリペプチドが蓄積する機構は不明である。その中で*esp-2*(CM1787)では57kDaポリペプチドがプロラミンポリペプチドと粗面小胞体内で均一に混じって顆粒状で存在し、PB-Iが正常に形成されない。一方、*glup-2*(EM305)では正常なPB-I以外に、大きさ0.5~1 $\mu$ mで電子密度の大きいグルテリン封入体の周囲に電子密度が小さい複数のプロラミン封入体を有する粗面小胞体由来の形態的に全く新しいPBが存在することが判った。さらに*Glup-1*でもPB-I以外に粗面小胞体内に電子密度が異なる小さな封入体が複数存在するものが見い出された。57H突然変異は、粗面小胞体ルーメンに電子密度の異なる封入体が独自に観察されることから、小胞体内におけるグルテリンとプロラミンポリペプチドの分布にかかわるものであると予想される。そこで、57kDaポリペプチドの、特に小胞体内分布の57H突然変異体間での相違について調べた。

【実験材料】57H突然変異体*esp-2*(CM1787), *Glup-1*(EM61), *glup-2*(EM305, EM964), *glup-4*(EM956, EM960), *glup-5*(EM856)及び対象品種として「金南風」と「台中65」の登熟種子を用いた。

【実験方法】1.PBの単離(SDG超遠心分画法): ショ糖溶液(52~64%)を用いてPBを比重の差により単離した。2.酵素処理法: マセロチームとセルラーゼ各々1%で37 $^{\circ}$ C 30分処理した。3.ウエスタンブロットニング: 抗グルテリンウサギIgGを用いた。4.登熟種子固定包埋: 登熟種子を化学固定後、LRホホワイト樹脂で包埋した。5.透過型電子顕微鏡(TEM)観察: 40~50nmの超薄切片を作成し、ホルムバル膜を張ったNiメッシュの上のせ、免疫染色および電子染色したものをTEMで観察した。

【結果及び考察】超遠心分析の結果、原品種金南風と台中65では57kDaポリペプチドはPB-Iより軽

い画分にはほとんど見られずむしろ少量ではあるがPB-II画分に見られた。*esp-2*, *Glup-1*, *glup-4*では57kDaポリペプチドはPB-I画分よりも軽い小胞体画分に広く存在した。しかし、*glup-2*と*glup-5*ではそれはPB-I画分よりも重い画分に広く存在した。酵素処理法でPB-IIを無傷で単離し、57kDaポリペプチドの存在の有無を確認したところ、*Glup-1*と*glup-2*ではPB-IIにはほとんど観察されなかった。*Glup-1*と*glup-4*では57kDaポリペプチドは恐らくPB-Iより比重の小さい小胞体の中に、一方、*glup-2*と*glup-5*ではPB-Iより大きい小胞体に存在すると思われる。これらのことは電子顕微鏡観察からも推測される(Fig.1)。以上のことから57H突然変異は何らかの原因で一部分の57kDaポリペプチドが小胞体から移動できなくなったものであると考えられる。また、プロラミンポリペプチドの小胞体内蓄積に際しBIPが深くかかわっていることを考え合わせると、これらの突然変異はBIPなどの分子シャペロンの変異によって、グルテリン前駆体がプロラミンポリペプチドと共に小胞体由来の膜に取り込まれると予測される。



Fig.1 Electron microscopy of r-ER including protein inclusions observed in developing endosperms of EM61 rice mutant. (Bar:200nm)

415 ° 熊丸敏博・佐藤 光 (九大農) イネ種子貯蔵タンパク質突然変異遺伝子 *esp-1* のマッピング  
 KUMAMARU, T. and H. SATOH (Fac. Agr., Kyushu U.) Mapping the mutant gene, *esp-1*, for seed storage protein in rice.

イネ貯蔵タンパク質突然変異遺伝子 *esp-1* は、プロテインボディ I に集積しているプロラミン、13b ポリペプチドを減少させる変異遺伝子である (Fig.1)。この遺伝子は、二次元電気泳動で分離した複数の 13b ポリペプチドを同時に減少させ、かつ劣性であるところから、プロラミン遺伝子群の発現を調節する遺伝子の突然変異として推定されている。この遺伝子の詳細な調査は、プロラミン遺伝子の発現調節機構の解明の一助になると考えられている。

*esp-1* 遺伝子は染色体 7 に座乗し、形態マーカー *rtb* と *ge* の間に座乗する。本研究では、この *esp-1* 遺伝子の RFLP 連鎖地図へのマッピングを行った。

材料には Kasalath と *esp-1* 遺伝子を保有する系統との交雑 F2 植物、125 個体を用いた。F2 個体当たり 2~3 粒の F3 種子からタンパク質を抽出し、1 粒ごとに SDS-PAGE 分析し、*esp-1* ホモ型個体を検出した。F2 個体の葉から全 DNA を抽出し、第 7 染色体に属する RFLP マーカーをプローブとして用いた。

F3 種子の SDS-PAGE 分析により、F2 個体の正常型個体と *esp-1* ホモ型個体は 98:27 の分離を示した。ヘテロ型個体の分離もみられたが、分析種子数が少

ないため、検出できなかったヘテロ型個体の存在が考えられるので、ここでは正常型個体の中にヘテロ型個体も含めた。

RFLP マーカーとの連鎖分析の結果、*esp-1* 遺伝子は RFLP マーカー R2394 と R1789 との間に、それぞれ 7.8cM、19.1cM の距離で位置付けられた (Fig.2)。

現在、*esp-1* 遺伝子の精密度連鎖地図の作成と共に、*esp-1* 遺伝子がプロラミン遺伝子の発現に及ぼす影響を調査中である。

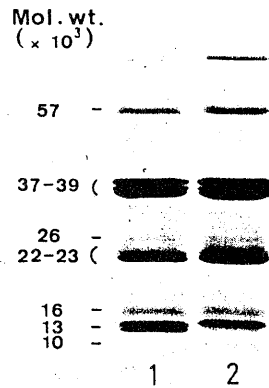


Fig. 1. SDS-PAGE analysis of the mutant protein affected by *esp-1* gene.  
 1: Original variety, Kinmaze.  
 2: *esp-1*.

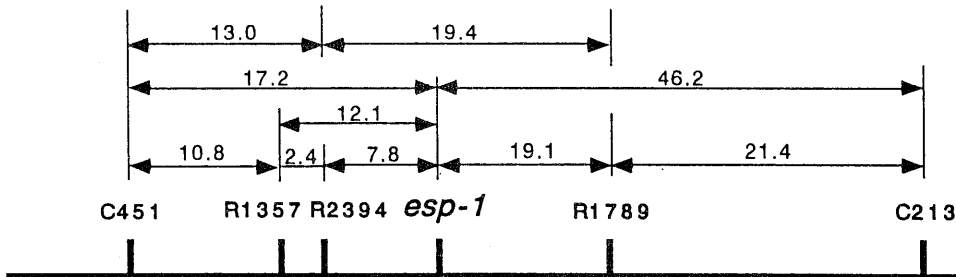


Fig. 2 Linkage map of chromosome 7 showing the location of *esp-1* gene.

416 ○曲 楽慶・佐藤 光 (九大農) イネのグルテリン $\alpha$ -2サブユニット欠損遺伝子の連鎖分析

QU, L.Q., H. SATOH (Fac. Agr., Kyushu U.) Linkage analysis of glutelin  $\alpha$ -2 subunit deletion genes in rice.

イネの MNU 受精卵処理後代中に得られたグルテリン $\alpha$ -2酸性サブユニット(以下 $\alpha$ -2サブユニットと略す)欠損変異体三系統: EM278( $\alpha$ -1サブユニット増加を伴う), CM1707( $\alpha$ -1と $\alpha$ -3サブユニット増加を伴う)と EM659( $\alpha$ -3サブユニット増加を伴う)は全て不完全劣性遺伝子に支配され、またその遺伝子は複対立遺伝子であることを第90回講演会で報告した。今回はこの結果に基づいて $\alpha$ -2サブユニット欠損を支配する遺伝子の座乗する染色体及び形態マーカー遺伝子との連鎖関係について検討する。なお、三系統の $\alpha$ -2サブユニット欠損変異遺伝子は複対立関係であったため、それぞれ  $glu-4^a, glu-4^b, glu-4^c$  と仮称した。

【材料と方法】材料には MNU 受精卵処理後代から得られた $\alpha$ -2サブユニット欠損突然変異系統 EM659( $glu-4^c$ )を用いた。

変異遺伝子の座乗染色体、連鎖関係を明らかにするために、EM659( $glu-4^c$ )と第4染色体から第12染色体までの染色体を過剰に持つトリソミック系統並びに第1染色体から第3染色体までに座乗する形態マーカー系統とを交配した。連鎖分析において、形態マーカーの調査を  $F_2$  植物で行い、 $F_3$  種子のタンパク質を SDS-PAGE 分析を行った。

【結果及び考察】EM659( $glu-4^c$ )とトリソミック系統との交配  $F_2$  の分析結果、 $P_1P_1$  型、 $P_1P_2$  型、 $P_2P_2$  型は 1 : 2 : 1 に一致する分離を示し、三染色体分離は認められなかった。これは  $glu-4^c$  遺伝子は第4から第

12までの染色体に座乗しないことを示している。

そこで、EM659( $glu-4^c$ )と第1、第2、第3染色体に関する形態マーカー系統とを交配し  $F_2$  分析を行った。その結果  $glu-4^c$  遺伝子は第1染色体に座乗する  $spl-6$ ,  $eg$  遺伝子との連鎖関係が認められ、他のマーカー遺伝子との連鎖関係は認められなかった(Table 1)。 $glu-4^c$  遺伝子は  $spl-6$ ,  $eg$  遺伝子とそれぞれ 17.2%, 24.2% の組換え価で連鎖していた(Table 2)。この組換え価から第1染色体にける遺伝子の排列は  $eg-spl-6-glu-4^c$  であることが明らかとなった(Figure 1)。

Table 1. Segregation between  $glu-4^c$  and marker gene

Gene comb.	Segregation in $F_2$					$\chi^2(9:3:3:1)$
	++	+ $glu-4^c$	$m^*+$	$m glu-4^c$		
<i>ls-2-glu-4^c</i>	35	18	11	5		2.70
<i>d-18-glu-4^c</i>	45	23	21	3		4.93
<i>rl-1-glu-4^c</i>	73	32	25	6		2.56
<i>A-glu-4^c</i>	35	15	11	8		4.15
<i>spl-6-glu-4^c</i>	72	37	26	1		12.08**
<i>eg-glu-4^c</i>	73	36	25	2		9.46*

\*:  $m$  — recessive marker genes

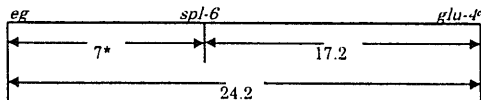


Figure 1. Linkage map among  $glu-4^c$ ,  $eg$  and  $spl-6$  genes on chromosome 1

\*: Iwata et al. (1979).

Table 2. Linkage analysis between  $glu-4^c$  and marker genes

Cross combination	Segregation in $F_2$						
	+++	+ $glu-4^c$	+ $glu-4^c glu-4^c$	$m^*++$	$m+glu-4^c$	$m glu-4^c glu-4^c$	cv(%)
<i>spl-6</i> $\times$ <i>glu-4^c</i>	16	56	37	18	8	1	17.2
<i>eg</i> $\times$ <i>glu-4^c</i>	18	55	36	16	9	2	24.2

\*:  $m$  — recessive marker genes

502 高部恵理子<sup>1</sup>・日下部新吾<sup>1</sup>・佐藤 光<sup>2</sup>・○北野英己<sup>1</sup>・長戸康郎<sup>3</sup>・(1.名大農, 2.九大農, 3.東大農 学生命科学) イネの初期胚発生にかかわる突然変異体  
 TAKABE, E.<sup>1</sup>, S. KUSAKABE<sup>1</sup>, H. SATOH<sup>2</sup>, H. KITANO<sup>1</sup> and Y. NAGATO<sup>3</sup> (Fac. Agr., Nagoya U., 2. Fac. Agr., Kyushu U. 3. Grad. Sch. Agr. Life Sci., Tokyo U.) Developmental mutants affect early embryogenesis in rice.

作物における胚発生の遺伝的制御機構の解明は、種実生産の観点からも重要である。演者らはイネの突然変異体を用いて研究を進めているが、これまでに作出した胚発生突然変異体中には、初期発生に関与すると思われる突然変異体が多数含まれていることが判明している(表1)。今回、これらの変異体に着目して、相互交雑による変異体間の遺伝関係を調べるとともに、胚の組織観察を通じて発生過程に見られる遺伝子発現の特徴を解析した。

表現型の解析とタイプ分け：観察対象とした変異体は、いずれも器官分化が認められないが、胚球の生長の程度と完成胚の形態的な特徴によって、無胚型、球状胚型、棍棒状胚型に分けられた。無胚型は、発生初期には胚が存在し、途中で分裂を停止し完成時に胚は痕跡を残す程度で消失するものが多く見られた(図1-a)。球状胚型は、得られている変異体の中では最も出現頻度が高く、いずれも類似した形態的特徴を示すものが多かったが、胚球のサイズに

ついては系統間でかなりの変異が認められた(200~800 μm)。球状胚型の変異体の多くは、野生型の球状胚段階で比較すると大型化していた。また、胚球を構成する細胞の形態にも異常を示す系統が見られた。球状胚型の胚は種子完成時においても表皮細胞が未分化な状態を示すものが殆んどであったが、棍棒状胚型では、胚軸方向に異常に生長する特徴を示すことのほかに、表皮細胞で正常胚で見られる胚盤上皮細胞が分化するといった点でも異なっていた。尚、いずれの変異体も胚の生長は野生型に比べてかなり遅れる傾向を示した。

変異体の遺伝解析：対象となる系統数が多く、すべての系統の遺伝関係を明らかにするには至っていないが、現在表1に示したような複数の対立座の存在が判明している。既に行なった交雑組み合わせの中では、独立遺伝の関係にあるものが多く認められていることから、これらの変異体にはさらに多くの異なる遺伝子座が存在しているものと予想される。

表1. イネ初期胚発生突然変異体

系統名	ヘテロ個体の出現頻度		劣性ホモ型個体の出現頻度		
	(%)	$\chi^2$ (2:1)	(%)	$\chi^2$ (3:1)	
<b>無胚 (8系統)</b>					
odm8	27/43 (62.8)	0.29	72/285 (25.3)	0.01	<i>eml1-1</i> ホモ型育成可
odm17	7/27 (25.9)	20.16**	60/384 (15.6)	18.00**	
odm82	11/17 (64.7)	0.03	39/178 (21.9)	0.91	<i>eml2</i>
odm98	19/33 (57.6)	1.23	59/247 (23.9)	0.16	ホモ型育成可
odm100	15/21 (71.4)	0.21	77/302 (25.5)	0.04	
odm187	14/19 (73.7)	0.42	72/296 (24.3)	0.07	<i>eml1-2</i> ホモ型育成可
odm188	6/20 (30.2)	12.10**	40/250 (16.0)	10.80**	
<b>球状胚型 (20系統)</b>					
odm1	25/37 (67.6)	0.01	80/334 (23.9)	0.20	<i>gle1</i>
odm7	15/22 (68.2)	0.02	56/240 (23.3)	0.36	<i>gle3</i>
odm12	23/35 (65.7)	0.01	74/312 (23.7)	0.27	<i>gle2-1</i>
odm20	15/24 (62.5)	0.19	79/334 (23.7)	0.32	<i>gle2-2</i>
odm23	19/33 (57.8)	1.23	60/260 (23.1)	0.51	
odm41	18/28 (64.3)	0.07	238/779 (23.4)	1.38	<i>gle4</i>
odm45	23/36 (65.6)	0.13	71/298 (23.8)	---	
<b>棍棒状胚 (4系統)</b>					
odm21	27/42 (64.3)	0.11	82/341 (24.0)	0.17	<i>cle1-1</i>
odm28	31/51 (60.8)	0.79	88/400 (22.0)	1.92	<i>cle1-2</i>
odm31	23/44 (52.2)	4.10*	65/270 (24.1)	0.12	<i>cle1-3</i>
odm196	7/14 (50.0)	1.75	46/187 (24.6)	0.02	

\*,\*\*: 各々5,1%で有意差あり



a.odm7 b.odm12 c.odm28  
 図1.初期胚発生突然変異体



503 ○木苗貴秀<sup>1</sup>・佐藤 光<sup>2</sup>・長戸康郎<sup>1</sup>（1.東大農学生命科学、2.九大農）イネの新しい胚発生突然変異体

KINAE, T.<sup>1</sup>, H. SATOH<sup>2</sup> and Y. NAGATO<sup>1</sup> (1. Grad. Sch. Agric. Life Sci., U. Tokyo, 2. Fac. Agri., Kyushu U.)  
Newly identified embryo mutants of rice.

植物の胚発生を解析する上で、胚発生突然変異体を用いることは有用な手段である。そのため、双子葉植物ではアラビドプシス、単子葉植物ではトウモロコシとイネで多くの胚発生突然変異体が同定されてきた。しかし、胚発生の複雑な制御過程から考えると、十分な系統数とは言えず、対立遺伝子を含め、新しい系統の同定が必要である。

本報告では、MNU処理を行ったイネ（台中65号）約1000系統の成熟胚を実体顕微鏡下でスクリーニングした後、樹脂切片で形態的観察を行った。その結果、約100系統の胚発生突然変異体が得られたため、それらの表現型をもとにグループに分類した。すべての系統において野生型と突然変異型の分離比がほぼ3:1を示したため、劣性一遺伝子突然変異であると考えられた。

得られた突然変異体の表現型は、1.無胚となるもの(2系統)、2.器官分化が見られないもの(14系統)、3.幼芽の分化が見られないもの(9系統)、4.幼芽もしくは幼根の数が増加するもの(2系統)、5.胚の大きさが変異するもの(8系統)、6.胚や器官の形態が異常になるもの(55系統)、7.穂発芽するもの(4系統)、8.一遺伝子の突然変異で

ありながら多様な表現型を示すもの(8系統)、の8種類に分類された。これらの分類群に属する系統数の割合は、これまでに同定されている変異体のものとはほぼ同じであった。また、幼芽を分化しない系統が9系統得られたのに対して、幼根を分化しない系統は得られなかった。

今回、新たに得られた興味ある突然変異は、幼根が複数分化するもの及び、幼芽が複数分化するものである。複数の幼根を分化する96T-8S-13は、1つの幼芽と2あるいは3個の幼根を分化した(図1.B)。幼芽は形態異常を示し、発芽後の植物体も分けつる増加など異常な形態を示した。幼根は形態的に比較的正常で、吸水後、複数の発根が見られる場合もあった。二つの幼芽と一つの幼根を分化する96T-2S-59は、一つの鞘葉と二つの茎頂分裂組織を分化した(図1.C)。幼芽は重度の形態異常であった。今回得られた突然変異体は、幼芽あるいは幼根のいずれかが並列的に重複するものである。これに対し、今までに同定されていた器官数に関する突然変異体は、幼芽と幼根が、鏡像対称で重複するものであり、両者は、異なる制御過程に突然変異が生じていると考えられる。

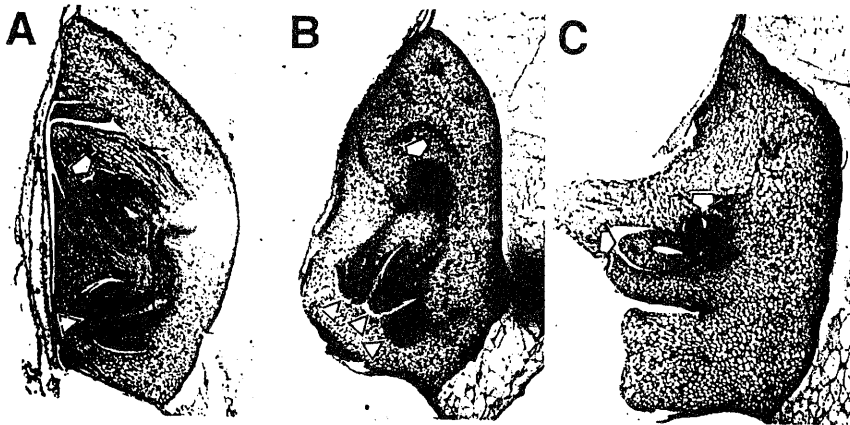


図1. 成熟胚の樹脂切片写真

(A)野生型、(B)96T-8S-13、(C)96T-2S-59、幼根は分化しているがこの切片には写っていない。矢印：幼芽、矢頭：幼根

515 ○浅井和美<sup>1</sup>・佐藤 光<sup>2</sup>・北野英己<sup>3</sup>・長戸康郎<sup>1</sup>（1.東大農学生命科学、2.九大農、3.名大農）  
イネシュートの形態構築に関する*mori*突然変異の解析

ASAI, K.<sup>1</sup>, H. SATOH<sup>2</sup>, H. KITANO<sup>3</sup> and Y. NAGATO<sup>1</sup>（1.Grad. Sch. Agric. Life Sci.,U. Tokyo, 2.Fac. Agri., Kyushu U., 3.Fac. Agri.,Nagoya U.）Analysis of *mori* mutation affecting shoot architecture in rice

植物体の地上部分であるシュートの形は、葉、側芽、節間の空間的な位置、サイズ、数によって制御されている。これらは種特異的であり、遺伝的に支配されていると考えられる。本発表では、この遺伝的機構に関与していると思われる、新しく得られた突然変異体についての解析を行った。

この*mori*突然変異体は、分けつが非常に多く、半年間以上生育させても個体が大きくならず全体が丸みを帯び、発芽後8ヶ月経っても、或いは短日処理しても、花芽形成しない、などの異常を示す。また、葉身、葉鞘とも伸長しない。そして、葉序は野生型と同じく1/2互生であるが、葉間期に関しては野生型よりも短く、およそ3.5倍の速度で葉が分化していることが確認された（図1）。

また、植物体が伸長しないことから、縦断切片による観察を行ったところ、1ヶ月以上経過しても節及び節間が形成されていないことが確認され、半年間以上経過した*mori*の節及び節間の分化は不完全で、野生型の下位節及び節間のような状態が続いていることが確認された（図2）。

花芽を形成しない、節及び節間の分化が不完全である、という以上の理由から、この*mori*は、juvenile-adult phase changeが起こらない、即ちjuvenile phaseが継続されている突然変異ではないかと考えられる。

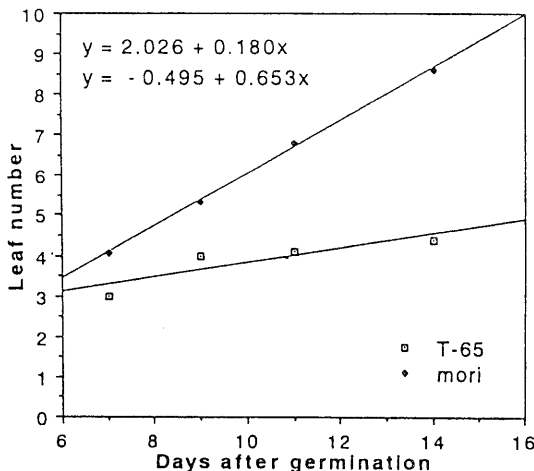


図1. 野生型と*mori*突然変異の発芽後の葉数の変化。

さらに、野生型と*mori*のSAMを比べると若干異なる形をしており、発芽後1週間の*mori*のSAMは野生型よりやや大きく、その後、野生型と比べると大きくなり、一定の大きさを保っていることが分かった。SAMの高さ/幅については、生育ステージに関わらず、ほぼ一定の割合であった。

次に、*mori*における細胞分裂活性を調べるために、*Histon4*をプローブとして*in situ* hybridizationを行った。野生型では、SAMにおけるシグナルは中央縦断切片あたり最も多いもので3~4細胞で検出されたが、ほとんどの切片は0~1細胞で検出されただけであった。一方*mori*のSAMでは、野生型より多いシグナルが観察された。少ないもので3~5細胞、多いもので12~14細胞で検出された。このことから、*mori*のSAMは、野生型より高い細胞分裂活性を保持していることが確認された。また、非常に低頻度ではあるが、*mori*ではSAMが2つに分裂することもあった。

以上の結果より、*MORI*遺伝子は、SAMにおける細胞分裂を制御することにより、葉原基の分化速度、juvenile-adult phase changeを統御する重要な遺伝子であると考えられる。

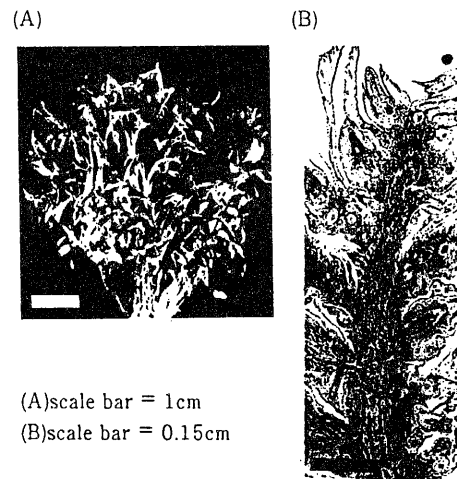


図2. *mori*突然変異体の表現型。  
(A)発芽後7ヶ月間生育した個体。  
(B)その茎の内部構造。

## 微生物遺伝子開発分野

日本農芸化学会大会（東京） 4月、1997年

### 2Ip19 バキュロウイルス-昆虫細胞発現系によるHIV-1 gp120の発現 原 敏夫、○和田将幸、牛島雄毅、今西重雄、小糸 厚<sup>1</sup>、服部俊夫<sup>2</sup>（九大・農・遺資研、蚕昆研、筑波大、<sup>3</sup>京大・ウイルス研）

【目的】 Human immunodeficiency virus (HIV) の感染はHIV envelopeであるgp120はCD4分子に結合し、免疫細胞に感染する。今回、バキュロウイルス-昆虫細胞発現系を用いて標的細胞が異なる3種類のgp120の発現を行った。

【方法及び結果】 HIV-1 envelopeである3種類のgp120遺伝子(SF2、SF33及びSF162)をトランスファーベクターpVL1393に導入し、リポフェクチン法にて組換え体ウイルスを作製した。10%FBSを含むIPL41培地及び無血清培地Sf900Hを用い、gp120を組み込んだ各ウイルスを昆虫細胞Sf21及びSf9にそれぞれ感染させ、gp120の発現を行った。3種類のgp120の発現の確認はウエスタンブロッティングで行った。ウエスタンブロッティングの結果、発現したgp120の分子量は約100kDaで、血清培地での発現量が無血清培地での発現量より上回った。また、gp120の発現量はウイルス感染後3~4日目に最大となった。そのとき、培養液上清に約26 mg/Lのgp120が発現した。

日本農芸化学会大会（東京） 4月、1997年

### 2Vp9 地熱水中における珪酸質鉱物生成に関与する高度好熱性微生物の解析 ○稻垣史生<sup>1</sup>、林秀<sup>2</sup>、土居克実<sup>1</sup>、本村慶信<sup>3</sup>、井澤英二<sup>4</sup>、緒方靖哉<sup>1</sup>（<sup>1</sup>九大・農・遺資研、<sup>2</sup>資環研、<sup>3</sup>九大・理・地球惑星、<sup>4</sup>九大・工・資源工）

【目的】 地熱発電所において、熱水輸送管等の地上設備や還元井に珪酸質沈殿物（シリカスケール）が付着し、運転トラブルの原因となる場合がある。本研究では、シリカスケールの形成に関与すると推察される微生物について検討を行なった。

【方法及び結果】 地熱発電所内の滞留槽（85~90℃、pH7.2）の熱水に銅版を設置し、シリカスケールの経時的付着量とDNA含量の定量実験を行った。銅板に付着したシリカスケールの生成量は、着水時間に対して対数的に増加した。得られた試料から凍結融解法によってDNAを抽出した結果、スケールの付着量に比例してDNA量が増加することが確認された。

次に、16S rDNAの部分塩基配列を用いた微生物相の解析結果<sup>1)</sup>をもとにして、*Thermus*属と類推される菌株を純粋分離した。本分離株は、黄色の色素を産生し、グラム陰性、カタラーゼ陰性を示し、対数増殖期後期に球状体を形成した。また、全16S rDNAの系統解析の結果、ニュージーランドで分離された*Thermus* sp. strain HS A.1と非常に高い相同性を示した。さらに、透過型電子顕微鏡観察によって、細胞末端に紡錘形の特異的な構造を確認した。現在、分離株を用いたシリカ吸着能について検討している。

1) 1996年度 日本農芸化学会講演要旨集 p.172

**3Cp15** 放射線照射による $\gamma$ -ポリグルタミン酸架橋体の合成  
○原 敏夫、尾崎 ゆう（九大・農・遺資研）

【目的】納豆菌が産生する $\gamma$ -ポリグルタミン酸(PGA)水溶液に $\gamma$ 線を照射するとPGA分子間で架橋反応が起こり、自重の数百～数千倍の水を吸水する透明なゲルが得られる。PGA架橋体の量産化を目的に、ゲル化率とPGA架橋体の収量増を目指し、PGA架橋体の合成条件及びその特性について検討した。

【方法及び結果】平均分子量530kDaのPGA水溶液を $N_2$ バブリング後、蓋付き10ml容サンプル瓶に2ml入れ、線源 $^{60}\text{Co}$ を線量率1.2kGy/h、室温で $\gamma$ 線を照射した。吸水して膨潤したPGAハイドロゲルを80メッシュの金網で濾過後、凍結乾燥し、PGA架橋体を得た。吸水率は吸水重量を乾燥重量で割り、ゲル化率は乾燥重量を仕込みPGA量で割ることにより求めた。ゲル強度はレオログラフゲルを用いて測定した。吸水率は、照射線量の増加により減少したが、PGA濃度に比例して増加し、PGA濃度15%以上では五千倍以上の吸水率を示した。しかし、PGA濃度20%ではゲル化率は50%まで低下した。PGAハイドロゲルの強度は1%寒天の強度とほぼ同じであった。

**3Cp16** 放射線照射による架橋体形成に及ぼす $\gamma$ -ポリグルタミン酸分子量の影響  
原 敏夫、○尾崎 ゆう（九大・農・遺資研）

【目的】納豆菌が産生する $\gamma$ -ポリグルタミン酸(PGA)水溶液に $\gamma$ 線を照射するとPGA分子間で架橋反応が起こり、自重の数千倍の水を吸水する透明なゲルが得られる。今回、PGA架橋体のゲル化率とPGA架橋体の収量に及ぼすPGA分子量の影響を検討した。

【方法及び結果】平均分子量10kDa、500kDa及び100kDaのPGA水溶液を用い、線源 $^{60}\text{Co}$ を線量率1.2kGy/h、室温で $\gamma$ 線を照射した。吸水して膨潤したPGAハイドロゲルを80メッシュの金網で濾過後、凍結乾燥して得られたPGA架橋体を用いて吸水率とゲル化率を算出した。ゲル強度は、5mm厚に切ったPGAハイドロゲルを圧縮加重1.6g/cm<sup>2</sup>のレオログラフゲルを用いて測定した。吸水率はPGA分子量に依存し、照射線量の増加により減少したが、重合度が低いと架橋体が形成できなかった。PGAハイドロゲル強度は分子量に係わらずほぼ同じ強度を示した。

**3Cp17** 放射線照射で合成した $\gamma$ -ポリグルタミン酸ハイドロゲルの微生物分解

○崔 聖賢、原 敏夫（九大・農・遺資研）

【目的】自重の五千倍の水を保持できる $\gamma$ -ポリグルタミン酸（PGA）架橋体は土質改良剤や農業用資材としての用途が期待される。PGAの生分解性については知られているが、PGA架橋体の酵素分解については未だ報告例がない。そこで、PGAハイドロゲルの低分子化を目的とし、PGAハイドロゲル分解菌を探索し、得られた分解菌からPGAハイドロゲル分解酵素を分離したので、その性質について検討した。

【方法及び結果】空気中からPGAハイドロゲル分解菌として細菌 PHG-4 株を得た。様々の菌学的性質より本菌を *Pseudomonas* 属の一種と同定した。PGAハイドロゲルの分解活性は156メッシュの金網を用いて濾液量から算出した。本酵素はPGAハイドロゲルによって誘導生成されずに、栄養培地で培養することによって強い活性を示した。本菌株を30℃で3日間培養した後、菌体破碎し、本酵素を精製した。酵素の諸性質、一般のプロテアーゼとの比較、及び $\alpha$ -ポリペプチドに対する分解活性を検討した。

**3Xp16** サイレージ乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* の *pfk* 遺伝子の同定と解析

○土居 克実、江口 智子、田中 治\*、大桃 定洋\*、緒方 靖哉  
（九大農・遺資研、農林水産省\*）

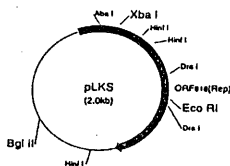
【目的】高乳酸発酵能をもつサイレージ乳酸菌の作出のため、*Lactobacillus plantarum* の乳酸発酵経路の遺伝子をクローニングし、その機能解析と改良を目的とした。特に、フルクトース 6-リン酸からフルクトース 1,6-二リン酸に至る経路を触媒する Phosphofructokinase をコードする *pfk* 遺伝子は、*L. plantarum* では報告例がない。本研究では、本遺伝子のクローニングと構造・機能解析を行い、高機能サイレージ乳酸菌の作出への寄与を試みた。

【方法・結果】*L. plantarum* IFO3070の全DNAをThomas-Marmur法に準じて抽出した。得られたDNAを鋳型とし、既に報告されている *pfk* の保存領域を基にして設計したプライマーを用いたPCRを行った。その結果、327bpの増幅断片を得た。本断片をプローブとし、*L. plantarum* IFO3070の遺伝子ライブラリーよりコロニーハイブリダイゼーション及びコロニーPCRを行い、約4kbの *Eco* RI断片をクローニングした。本断片より得られた *pfk* 遺伝子は、*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* LM0230株の *pfk* と塩基配列レベルで71%、アミノ酸配列レベルで72.4%と非常に高い相同性を示した。また、*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*、*Bacillus stearothermophilus*、*B. macquariensis* の *pfk* とも高い相同性を示した。更に高乳酸発酵株からの本遺伝子のクローニングを行い、構造の比較を行っている。また、*pfk* と隣接して座位すると推定される Pyruvate kinase 遺伝子 (*pyk*) のクローニングを行っている。

**4Sp2** サイレージ乳酸菌のファージ耐性に関するプラスミドの構造・機能解析  
○江口智子、土居克実、田中治\*、大桃定洋\*、緒方靖哉  
(九大農・遺資研、農林水産省)

【目的】サイレージより分離された乳酸桿菌NGRIO101株は大きさの異なる二種のプラスミド、pLKL(約6.5kb)とpLKS(約2.0kb)を有していた。これらの機能解析を試みたところ、pLKLは宿主の生育に、pLKSはファージ耐性に関与することが示唆された。このうち、pLKSのファージ耐性への関与を検討するため、本プラスミドの構造と機能の解析を試みた。さらに本プラスミドを用いた乳酸菌-大腸菌のシャトルベクターの構築を目指した。

【方法及び結果】pLKSを各種制限酵素で切断し、制限酵素地図を作製したところ、Xba I、Bgl II、Eco RIのユニークサイトが存在した。pLKSをpUC119のEco RIサイトに挿入して構築した組換えプラスミドのシーケンスを行った結果、918bpからなるORFが認められた。本ORFは*Lactobacillus acidophilus*のプラスミドpLA105のRepA、RepB、*Pediococcus halophilus*のプラスミドpUCL287のRep 287とそれぞれ71.1%、65.3%、64.5%のホモロジーを示した。これより、本ORF産物がpLKSの複製に関与すると推察した。また、本プラスミド上のファージ耐性に関与する遺伝子の検索を行った。



**4Ta11** *Streptomyces azureus* のmin D 様遺伝子の構造と機能解析  
○酒見博士、西山孝、李範錫、土居克実、緒方靖哉  
(九大農・遺資研)

【目的】*S. azureus* ATCC14921のプラスミドpSA1非保持株PK100Cの染色体DNAライブラリーから、気菌糸形成能を欠損した形質転換株Bal A1を得た。本株から分離した組換えプラスミドpSAB931中に2.5kbp挿入断片を検出し、塩基配列の決定を行ったところ、489bpの不完全なORFが確認された。orf489から推定されるアミノ酸配列は、*B. subtilis*のセプタ形成に関与するMinDのN末端部分に相同性を示したことから、orf489が*S. azureus*のmin D様遺伝子と推察した。本研究は、放線菌のmin D様遺伝子の機能を解明のために、orf489の下流域をクローニングし、塩基配列を決定することを目的とした。

【方法及び結果】orf489を含む約530bpのDNA断片をプローブとし、PK100C株の全DNAを数種の制限酵素で処理したものとサザンハイブリダイゼーションを行った。この結果、Sac I-Sph Iで処理した場合にorf489の下流域を含むと推測される約2.5kbpの断片が検出された。本断片をクローニングし、シーケンスを行い、塩基配列を決定した。

**4Ta12** *Streptomyces azureus* 染色体上の *spo IIIIE* 様遺伝子

○山田 修司、横山 英之、小野 泰典、土居 克実、緒方 靖哉  
(九大農・遺資研)

【目的】 *S. azureus* の接合性プラスミド pSA1.1上に宿主の胞子形成を阻害し、菌糸間伝達に関与する *spi* (1326bp)が同定されている(*Biosci. Biotech. Biochem.* 57: 438-443. (1993))。本遺伝子は *B. subtilis* の胞子形成時のDNA分配に関与する *spolIIE* とアミノ酸配列レベルで高い相同性が認められた。また、*spi* は放線菌プラスミドの *tra* 遺伝子や他の *spolIIE* 様遺伝子と同様、DNAの膜貫通伝達に関与する mononucleotide binding site (MNB) のコンセンサス配列を保持していた。本研究では、*S. azureus* をはじめとする放線菌の染色体上に MNB を保持した *spo IIIIE* 様遺伝子の存在を検討した。

【方法・結果】 *S. azureus* のプラスミド非保持株 PK100C をはじめとする 24 種の放線菌株の全DNAを抽出後、*Bam* HI で切断し、pSA1.1の *spi* を含む *Aat* I 断片 (2668bp) をプローブとしたサザンハイブリダイゼーションに供した。その結果、*S. azureus* の他、10 菌株でハイブリダイズしたバンドが確認された。これらのうち、PK100C 株では、2本のバンド (8.5kb, 5.7kb) が検出されたが、*spi* よりサイズが大きいこと、及び *spi* 内部に存在しない *Bam* HI サイトをもつことなどから本断片は *S. azureus* 染色体上の *spo IIIIE* 様遺伝子であると推測した。次に、MNB を含む pSA1.1 の *Sal* I 断片 (691bp) をプローブにした場合にも、同様のハイブリダイゼーションパターンが認められたことから、本 *spo IIIIE* 様遺伝子にも MNB が保存されていることが示された。更に、本遺伝子を、*Sal* I 断片 (3.5kb) として pUC118 ベクター中にクローニングし、塩基配列の決定を行い、その構造・機能を検討した。

**4Ta13** *Streptomyces laurentii* の線状プラスミド pSLL の性状

○伊良皆千鶴 北原真樹 土居克実 緒方靖哉 (九大農・遺資研)

【目的】 チオストレプトン生産菌 *S. laurentii* ATCC 31255 は自然誘発性 pock を形成する。<sup>1)</sup> 本株より、pock 形成に関与する環状プラスミド pSLS (16kb) の切り出しを抑制する線状プラスミド pSLL (93kb) が分離された。<sup>2)</sup> 本研究では、pSLL の伝達能及び宿主の胞子形成やチオストレプトン産生に及ぼす作用を検討した。

【方法と結果】 *S. laurentii* 野生型株 (P0 株) は pSLL を保持するが、固体培養では安定的に保持されず、継代培養により pSLL 脱落株 (P1 株) が生じた。P1 株は、P0 株に比べ、胞子形成能が著しく低下し、また、チオストレプトン産生量も減少した。この P1 株の UV 処理によって得られた、バリン・インロイシン要求性株の P1a 株と P0 株を混合培養したところ、液体培養では得られなかったが、固体培養では pSLL が P1a 株に伝達した形質転換体が得られた。本形質転換体は、P0 株レベルの胞子形成能及びチオストレプトン産生能を回復した。これらのことから、pSLL は自己伝達能、胞子形成及びチオストレプトン産生を促進する機能を有することが示唆された。

1) C.K. Iramina et al., *Biosci. Biotech. Biochem.*, 59(6), 1040(1995)

2) 1996年度 日本農芸化学会講演要旨集 P252

**4Ta14** *Streptomyces azureus* のpock形成プラスミドpSA1.1の複製と菌糸内伝達に関する遺伝子の構造と機能の解析  
○松崎友美、横山英之、土居克実、小野泰典、緒方靖哉  
(九大農・遺資研)

【目的】 *S. azureus* ATCC14921のpock形成プラスミドpSA1.1では接合伝達と孢子形成阻害に関する遺伝子*spi*、*spi*の制御に関する遺伝子*imp* オペロン、複製制御遺伝子*pra*等が同定されている。しかし、複製開始蛋白質をコードする*rep*遺伝子や菌糸内伝達に関する*spd*遺伝子が検出されていなかった。本研究はpSA1.1の複製と菌糸内伝達に関する遺伝子を同定し、その構造と機能を解析することを目的とした。

【方法及び結果】 pSA1.1の未決定領域の約4Kbのシークエンスを行い、その塩基配列中に678bp、及び1371bpからなる二つのORFを検出した。ホモロジー検索の結果、*orf678*の推定されるアミノ酸配列は、*Streptomyces ambofaciens* のpock形成プラスミドpSAM2の菌糸内伝達に関するSpdAと43%、またORF1371の推定アミノ酸配列は、pSAM2の複製開始蛋白質RepSAと50.2%の高い相同性が認められた。また、*ori*の同定と最小レプリコンの構築を行い、pSA1.1の欠失、挿入変異体を作製して、*orf678*の菌糸内伝達への関与を検討している。

**4Tp8** *Streptomyces lividans* TK24 のヒストン様タンパク質をコードする遺伝子のクローニング  
○横山英之、土居克実、緒方靖哉（九大・遺資研）

【目的】 放線菌の染色体は、細菌でありながら直鎖状の構造を持つ。また、形態分化の過程で、基底菌糸から気菌糸にかけては多核であり、分化の最終段階の孢子では単核になる。しかし、DNAの構造維持、複製及び分配に関する機構は不明な点が多い。著者らは、これまでにDNAの複製や構造維持等に関するヒストン様タンパク質と相同性の高いタンパク質HS Iを*Streptomyces lividans* から分離したことを報告した<sup>1)</sup>。今回は、HS Iタンパク質をコードする遺伝子をクローニングしたので報告する。

【方法及び結果】 HS Iタンパク質のN末端のアミノ酸配列と、この配列と相同性の高いN末端配列を持つ*Rhizobium meliloti* のHRmタンパク質のC末端のアミノ酸配列に基づいて、2組のプライマーを合成し、*S. lividans* の染色体DNAを鋳型としたnested PCRを行った。nested PCR産物をプローブとして、*S. lividans* の染色体DNAからHS Iタンパク質をコードする遺伝子をクローニングし、*hup* 遺伝子と命名した。DNA塩基配列から推定されるHS Iタンパク質のN末端アミノ酸配列、分子量及びpIは、前回報告したHS Iタンパク質の性質とよく一致していた。HS Iタンパク質の推定アミノ酸配列と多くのヒストン様タンパク質とで高い相同性が認められた。

1) Yokoyama et al., *FEMS Microbiol. Lett.* **138**, 197-200 (1996)



**4Dp11** 加圧処理した昆虫細胞抽出液のゲル濾過画分による翻訳能の向上

○榎井 寛、西川茂道\*、今西重雄\*\*、原 敏夫（九大・農・遺資研、\*和研薬、\*\*蚕昆研）

【目的】無細胞翻訳系では、ゲル濾過により低分子物質の除去を行い、蛋白質含量の比較的多い画分の混合液を細胞抽出液として翻訳反応に利用している。今回、加圧型細胞破壊装置を用いて調製した細胞破壊液をゲル濾過後、翻訳反応に必要な装置を含む画分をゲル濾過素通り画分から選択することにより、昆虫細胞抽出液による翻訳能の向上を目指した。

【方法及び結果】コンテス社製ミニポンベ細胞破碎器を用い、窒素ガスで加圧後、急激に大気圧に戻すことにより昆虫細胞(Sf21)を破壊した。細胞破壊液を遠心分離後、上清をゲル濾過に供し、素通り画分を得た。鋳型としてBMV mRNAを用い、翻訳産物へのビオチン標識リジンの取込みをECL検出キットで検出し、細胞抽出液の翻訳能を求めた。翻訳能は窒素ガスによる加圧時間に大きく依存し、また各画分単独での翻訳能はそのOD<sub>260</sub>値に比例した。一方、OD<sub>260</sub>値がピークを示した画分に一つ前の画分を添加することにより翻訳能は向上し、特に、加圧時間15分間ではその翻訳能が2.5倍以上に達した。

*Streptomyces azureus*のペレット形成に及ぼすバシトラシンと  
 $Mg^{2+}$ の作用

緒方隆博、Okba Adel Kamal、土居克実、○緒方靖哉（九大農・  
遺伝子資源開発研究センター）

バシトラシン（BC）は、多くのグラム陽性菌の細胞壁ペプチドグリカン合成経路に作用し、生育を阻害する。しかし、BCは、グラム陽性菌である *Streptomyces azureus* に対して、孢子形成及び気菌糸伸長の促進や液内菌体量の増加に作用する。本研究は、*S. azureus* の液体培養におけるBCの生育促進作用の解明を目的として、ペレット形成に及ぼすBCの作用を検討した。

*S. azureus* は、BC添加によってBC無添加の場合に比べ生育が良好になり、またペレットの形成が抑制された。まず、本生育促進作用とペレット形成との関連性を調べるため、ペレット形成に著しい差が認められる2種のBennett液体培地（Medium A, B）を調製した。BC無添加の場合、Medium BではMedium Aよりペレット形成が顕著であり、菌体量が減少した。しかし、Medium BへのBCの添加は、ペレット形成の著しい抑制と、菌体量の増加を引き起こした。これらの結果は、BCがペレット形成を抑制し、生育を促進することを示唆している。使用した培地のビーフエキス及びイーストエキス中の金属イオン含有量を測定したところ、 $Mg^{2+}$  等のいくつかの金属イオン含有量に違いが認められ、これらの金属イオン含有量の違いは、Medium AとB間での本菌の生育とペレット形成の違いに關与すると推測した。

次に、BCの抗菌作用がキレート剤であるEDTAによって阻害されることに着目し、BCの本生育促進作用に及ぼすEDTAの影響について検討を行った。EDTAは濃度の増加に伴い、ペレット形成を抑制したが、本菌の生育を阻害した。しかも、EDTA存在下では、BCの生育促進作用が認められなくなった。従って、BCの生育促進作用及びペレット形成には $Mg^{2+}$  等の2価金属陽イオンの關与が推測された。

さらに、Bennett培地は2mMの $MgSO_4$ を含有していることをふまえ、 $Mg^{2+}$ のペレット形成とBCの生育促進作用への關与を検討した。 $Mg^{2+}$ の濃度を増加させた場合、ペレットの形成は促進され、菌体量が減少した。しかし、 $Mg^{2+}$ の濃度を減少させると、ペレットの形成は抑制され、菌体量が増加した。一方、BCは、培地中の $Mg^{2+}$ 濃度が高く、ペレット形成が起こる場合には、ペレット形成を抑制して生育を促進させ、逆に、 $Mg^{2+}$ 濃度が低く、ペレット形成が起こらない場合には、生育を抑制した。これらの結果は、本菌のペレット形成が培地中の過剰の $Mg^{2+}$ に起因し、ペレット形成が本菌の生育を抑制することを示している。

以上の結果から、BCは、主としてBennett培地中の過剰の $Mg^{2+}$ と結合して、ペレット形成を抑制することにより、生育促進作用を示すことが推察された。

*Streptomyces azureus* の形態分化阻害に関与する  
染色体DNA断片（その2）

○西山孝、酒見博士、土居克実、緒方靖哉  
（九大農・遺伝子資源開発研究センター）

〔目的〕 *S. azureus* ATCC14921 のプラスミドフリー株 PK100C の染色体DNAライブラリの形質転換株から得られた Bal A1 株は、気菌糸形成性欠損、抗生物質生産性の変化、野生型株や他菌株に対する生育阻害と色素分泌の早期誘発などの性質を示した。本菌株が保持するプラスミド上の2.5kbp挿入断片中には *orf834*、*orf489* の2つのORFが確認され、推定アミノ酸配列はそれぞれ *Mycobacterium leprae* の phosphoserine phosphatase 様タンパク質、及び *Bacillus subtilis* のセプタ形成に関与するタンパク質 MinD のN末端部分と相同性があった。これらのORFについてさらに解析を行った。

〔方法と結果〕 *orf489* は下流部を欠く不完全なORFであったので、染色体DNAライブラリから完全なORFを含む断片のクローニングを行った。塩基配列を決定し、フレーム解析を行った結果、*orf489* は294bp延びた783bpのORFとして染色体DNA上に存在することが明らかになった。また、この783bpのORFの推定アミノ酸配列は *B. subtilis* でセプタ形成阻害作用を持ち、セプタが正しく菌体中央部に形成されるために必要なタンパク質 MinD と全体にわたって相同性を示した。本783bpのORFを *minDSA* と名付けた。Bal A1 株では2.5kbp断片が多コピープラスミドに挿入されたため、*minDSA* 産物が大量に発現し、固体培養菌上の気菌糸形成阻害が起こったと推察された。

また、*orf834* を推定産物のアミノ酸配列の相同性から *pspSA* と名付けた。*pspSA* の産物は代謝分化に関与していると推察され、現在、pETベクターを用いて大腸菌内での発現を行い、生化学的機能の解析、代謝分化系への関与の検討を行っている。

Xth International symposium on Biology of Actinomyces (北京) 5月、1997年

**Analysis of chromosomal DNA fragment concerned with inhibition of morphological differentiation in *Streptomyces azureus***

Takashi Nishiyama, Hirohito Sakemi, Shorin Matsuo, Katsumi Doi and Seiya Ogata

Institute of Genetic Resources, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Higashi-ku, Fukuoka, 812-81, Japan.

A 2.5kb DNA fragment from chromosomal DNA library of thiostrepton producing strain *Streptomyces azureus* was cloned. Transformant BalA1 having recombinant plasmid pSAB931 lacked in aerial hyphae-forming ability. Strain BalA1 made a larger inhibitory zone on a sensitive bacterium, *B. subtilis* ATCC 6633, than the parent strain, and also induced early production of an antibiotic undecylprodigiosin in *Streptomyces coelicolor* and *Streptomyces lividans*, and inhibited growth of the parent strain and other thiostrepton producing (thiostrepton resistant) strains. Therefore, it was supposed that the fragment coded some functional genes concerned with morphological and physiological differentiation.

Nucleotide sequence of the fragment had been analyzed. By frame analysis, two ORFs, *orf489* and *orf834*, were found. Predicted amino acid sequences of *orf489* and *orf834* showed homologies to MinD protein of *Bacillus subtilis* and phosphoserine phosphatase-like protein of *Mycobacterium leprae*, respectively. It was also supposed that *orf489* and *orf834* were related to morphological and physiological differentiation, respectively.

Xth International symposium on Biology of Actinomyces (北京) 5月、1997年

**The structural and functional analysis of the conjugative plasmid pSA1.1 in *Streptomyces azureus* ATCC14921**

Katsumi Doi, Yasunori Ono, Eiji Yokoyama, Yumi Matsuzaki, Shuji Yamada and Seiya Ogata

Microbial Genetic Division, Institute of Genetic Resources, Faculty of Agriculture, Kyushu University, 6-10-1, Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka 812-81, Japan.

The thiostrepton-producing *Streptomyces azureus* ATCC14921 harbored a plasmid pSA1 and its multi-copy derivative pSA1.1 together with its chromosomal integrated sequence (pSA1<sup>int</sup>). This report describes the structural and functional analysis of the conjugative plasmid related to pock formation of its host colony.

In the nucleotide sequence of plasmid pSA1.1, seven genes were identified. The *spi* and *praSA* were similar to *traSA* and *pra* of plasmid pSAM2 in *S. ambofaciens*, respectively. The functions of *spi* were plasmid transfer and inhibition of sporulation. Spi protein also showed high similarities SpoIIIE of *Bacillus subtilis* and SpoIIIE-like protein of some non-sporulating bacteria. Southern blotting showed the existence of *spoIIIE*-like genes on the chromosomes of *S. azureus* and some other actinomycetes. The *impSA-impSB* showed high similarities with *imp* operon of plasmid SLP1 in *S. coelicolor* A3(2), which might be needed for the regulation of *spi*. The *int*, *xis* and *attP* were contained in site-specific integration and excision of pSA1 and pSA1.1.

**Histone-like protein of *Streptomyces lividans* TK24**

Eiji Yokoyama, Shorin Matsuo, Katsumi Doi and Seiya Ogata

Institute of Genetic Resources, Faculty of Agriculture, Kyushu University,  
Higashi-ku, Fukuoka 812-81, Japan.

A DNA-binding protein (about 10 kDa and pI > 9.7) of *Streptomyces lividans* TK24 was purified on a denatured DNA-Cellulose column, and then on a native DNA-Cellulose column. The N-terminal amino acid sequence of this protein had high homology with small basic DNA-binding proteins known as histone-like proteins. Thus, this protein was designated HSI (histone-like protein of *S. lividans*).

The internal region of the *hup* gene encoding the HSI protein was amplified by nested PCR and was used as a probe to screen the *hup* gene from the gene library of *S. lividans* TK24. The *hup* gene was cloned and sequenced. The deduced N-terminal amino acid sequence, pI (9.95) and molecular mass (9851 Da) were in good agreement with characteristics of the HSI protein. The *hup* gene hybridized with the *AseI* fragment C in the 9-10 o'clock region of the chromosome of *S. lividans* ZX7. Total DNAs of many *Streptomyces* species hybridized with the internal region of the *hup* gene of *S. lividans* TK24.

**Stimulatory effect of bacitracin on submerged mycelial growth  
of *Streptomyces azureus***

Takahiro Ogata, Okba Adel Kamal, Shorin Matsuo, Katsumi Doi and Seiya Ogata.

Institute of Genetic Resources, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Higashi-ku,  
Fukuoka 812-81, Japan.

Antibiotic bacitracin (BC) is inhibitory towards peptidoglycan biosynthesis of many gram positive bacteria. However, BC has been reported to stimulate spore formation, aerial mycelial growth and submerged mycelial growth in a gram positive bacterium *Streptomyces azureus* (*Appl. Microbiol. Biotech.* 37, 652, 1992). The increase in the submerged mycelium mass caused by BC inversely caused a decrease in the formation of pellets consisting of mycelial aggregation. This paper describes the relationship between pellet formation and stimulatory effect of bacitracin on the submerged growth of *S. azureus* in Bennett medium.

Mg<sup>2+</sup> at more than 0.2mM participated in the promotion of pellet formation. BC(80 μg/ml) remarkably inhibited mycelial growth at 0 and 0.2mM Mg<sup>2+</sup>, but stimulated its growth at 2 and 10mM Mg<sup>2+</sup>. The maximum mycelium mass was obtained at 2mM Mg<sup>2+</sup> with BC, and at 0.2mM Mg<sup>2+</sup> without BC. We suggested that BC combined with excessive Mg<sup>2+</sup> in the medium and canceled the harmful action of Mg<sup>2+</sup> leading to pellet formation. The suppression of pellet formation by BC might lead to growth stimulation.

## 微生物の分化に見られる遺伝子機能の保存性と多様性

○土居克実、横山英之、西山孝、緒方靖哉  
（九大農・遺伝子資源開発研究センター）

微生物の分化は、形態分化と代謝分化に大別され、近年活発な研究がなされている。形態分化の分子生物学的研究の主流は、基底菌糸、気菌糸を経て外生胞子を形成する *Streptomyces* 属 (図 1) 及び内生胞子を形成する *Bacillus* 属 (図 2) で行われている。一方、胞子形成性微生物には抗生物質をはじめとする二次代謝産物を生産する菌株が非常に多く存在するが、*Streptomyces* 属菌株で圧倒的に多種多様な物質が得られている。一次代謝系から二次代謝系への移行は代謝分化或いは生理的分化と呼ばれ、代謝分化には形態分化と誘発条件に共通性があり、両分化の過程が一部共通の機構によって制御されることなどが知られている。両分化に関与する遺伝子の分離、構造と機能、さらにこれらの発現制御機構に関する研究が現在展開されている。特に、A-ファクターによる分化誘発調節機構、気菌糸形成を制御する *bld* 遺伝子群や胞子形成を制御する *whi* 遺伝子群等のネットワークに関する研究が進んでいる。本シンポジウムでは、放線菌・枯草菌を中心とした分化に関わる遺伝子とその機能に見られる保存性と多様性について紹介する。

### 1) 形態分化・代謝分化に関与する遺伝子

原核生物にも普遍的に外的環境要素に適応する機能が備わっている。その保存されている機構の一つが蛋白質のリン酸リレーによる 2 成分制御系である。*B. subtilis* では栄養源の枯渇、GTP 濃度の減少等のシグナルによってリン酸リレーが機能し、不可逆的に胞子形成が進行する。この胞子形成開始時には他の多くの 2 成分制御系調節遺伝子と高い相同性を示す *spo0A* やリン酸リレー系の phosphotransferase をコードする *spo0B*、センサー蛋白質である His 蛋白質 kinase をコードする *kinA*、*kinB* 等の遺伝子群が作用する。胞子形成が開始されると、*spoII*、*spoIII*、*spoIV* 遺伝子群による  $\sigma$  因子のカスケードによって胞子形成が完了する (図 2)。一方、放線菌では *S. lividans* の抗生物質生産を調節する His/Asp 型のリン酸リレーを行う 2 成分制御系である AfsQ1/AfsQ2 や、*S. griseus* の気菌糸形成に関与する 2 成分制御系の調節蛋白質をコードする *amfR* が報告されている。さらに *S. coelicolor* A3(2) では真核生物に共通する Ser/Thr kinase や Tyr kinase と相同性を示す AfsK の存在が明らかになった。このように放線菌の形態・代謝分化には、原核生物に広汎に存在する 2 成分制御系と真核生物に共通する Ser/Thr kinase が共に重要な役割を果たしていることが判り、原核生物中最も進化した微生物である放線菌の遺伝子機能の保存性と多様性の更なる解明が期待される。また、*S. azureus* においても形態分化と代謝分化を同時に支配する 2

種の遺伝子が検出され、それらの構造が原核及び真核生物の遺伝子との間に興味深い相同性を示したので紹介する。

## 2) DNA 転移と複製に関与する遺伝子の保存性と多様性

演者らは *S. azureus* の接合性プラスミド pSA1.1 上に孢子形成阻害遺伝子 *spi* を同定し、*B. subtilis* の *spoIIIE* との相同性を見出した。*spi* は放線菌の孢子形成遺伝子でははじめて *B. subtilis* 遺伝子と相同性を示した遺伝子である。遺伝子破壊とモチーフ解析から *spi* が接合伝達に機能することが明らかになり、一方、*spoIIIE* も孢子形成時の DNA 分配に必須で、この分配が接合伝達に類似した機構で行われることが報告された。近年、膜貫通型 DNA 転移遺伝子機能の保存性と多様性が話題になっており、図 3 に示した遺伝子産物の他、放線菌染色体及び F 因子や Ti プラスミドの転移遺伝子産物、*Klebsiella* の細胞外蛋白質分泌遺伝子産物、*Pseudomonas* の twitching motility を支配する遺伝子産物などにも類似した性質が認められる。

図 3 のように、アミノ酸配列を SpoIII E 及び Spi を基準としてアライメントすると、P ループを形成する mononucleotide binding site (MBS) のモチーフ A、B1 と B2 がほぼ一定距離に配列されていた。また、SpoIII E 或いは SpoIII E 様蛋白質はプラスミドの各 Tra 蛋白質に比べて大きく、N 末端側に transmembrane helix (Tx) を複数個保持する。一方、Tra 蛋白質は明瞭な Tx 構造を持つものが少なく、Tra、TraSA、Spi は共に MBS が A-B2-B1 の順に配列しており、それらのモチーフ間の距離もほぼ一定であるという特異性が認められた。なお、B1、B2 モチーフも疎水性領域をもつ膜貫通ドメインとして捉える考え方もある。ATP transporter superfamily も MBS と Tx をもつ蛋白質グループであるが、これらが糖、アミノ酸、ポリペプチド等の輸送体として機能するのに対し、SpoIII E や Tra 蛋白質は DNA の転移に機能している。これらのモチーフを保存している蛋白質においても、機能に多様性があり、さらに、その分布もグラム陽性・陰性に関わらず、染色体及びプラスミド上に座位することは興味深い。更なる遺伝子配列データの蓄積と解析によって、DNA 転移遺伝子の起源・伝播・多様化の論証が期待できる。

*spi* 遺伝子産物の機能によって pSA1.1 は伝播し、ローリングサークル型の複製を行う (図 4)。この転移と複製には、1 本鎖 DNA 結合蛋白質が必須であると考えられた。そこで目的のヒストン様蛋白質 HSI を宿主から分離し、コードする遺伝子 *hup* をクローニングして、HSI の推定アミノ酸配列と相同性を持つ蛋白質を検索した。その結果、細菌由来のヒストン様蛋白質をはじめ、古細菌や藻類のクロロプラストのヒストン様蛋白質に相同性が認められた。放線菌のヒストン様蛋白質 HSI は DNA の結合に必須なアーム領域の保存配列 ([GSK]-F-x(2)-[LIVMF]-x(4)-[RKEQA]-x(2)-[RST]-x-[GA]-x-[KN]-P-x-T) を保持していたが、図 5 に示すように細菌由来の中では、比較的系統的に離れていることが明らかになった。

日本生物工学会大会（東京） 9月、1997年

*Streptomyces lividans* TK24 のヒストン様タンパク質

（九大・遺資研，\*遺資工）○横山英之，土居克実，久原哲\*，緒方靖哉

〔目的〕放線菌の染色体は，細菌でありながら直鎖状の構造を持つ。また，形態分化の過程で，基底菌糸から気菌糸にかけては多核であり，分化の最終段階の胞子では単核になる。しかし，DNAの構造維持，複製及び分配に関する機構は不明な点が多い。演者らは，これまでにDNAの複製や構造維持等に関するヒストン様タンパク質に属するHSIを*Streptomyces lividans* TK24から分離している。<sup>1)</sup>今回は，HSIをコードする遺伝子をクローニングし，その構造を解析したので報告する。<sup>2)</sup>

〔方法と結果〕*S. lividans* の染色体DNAを鋳型としたnested PCRを行い，得られたHSIをコードする遺伝子*hup*の内部配列をプローブとして，*hup*をクローニングした。HSIの推定N末端アミノ酸配列，分子量及びpIは，既に報告したHSIの性質とよく一致していた。HSIの推定アミノ酸配列は，多くのヒストン様タンパク質と高い相同性を持ち，DNAとの結合に必須なアーム領域の保存配列も保持していた。また，UPGMA法により系統解析を行ったところ，細菌由来のヒストン様タンパク質とは比較的系統的に離れていることが示唆された。

1) Yokoyama, E. et al., *FEMS Microbiol. Lett.* **138**, 197-200 (1996)

2) Yokoyama, E. et al., *Biochim. Biophys. Acta* (in print)

Histone-like protein of *Streptomyces lividans* TK24

○Eiji Yokoyama, Doi Katsumi, Satoru Kuhara\*, Seiya Ogata

(Inst. Genet. Resources, \*Dept. Genet. Res. Tech., Kyushu Univ.)

〔Key Words〕 cloning, histone-like protein, phylogenetic analysis, *Streptomyces*

日本生物工学会大会（東京） 9月、1997年

Effects of divalent cations and chelators on pellet formation of *Streptomyces azureus*

○Adel K. Okba, Takahiro Ogata, Shorin Matsuo, Katsumi

Doi and Seiya Ogata. (Inst. Genet. Resources, Kyushu Univ.)

In the liquid culture, the mycelium of a thiostrepton - producing *S. azureus* ATCC 14921 grew in a compact pellet form. We discuss the effects of divalent cations such as  $Mg^{2+}$  and others and chelators such as EDTA and bacitracin (BC) on pellet formation and mycelial growth. BC prevented pellet formation, and growth forms changed from compact pellets of mycelium to dispersed or fragmented mycelium. BC inhibited growth during the early stage of culture, but after a long lag time (ca. 25 hr.), BC stimulated its growth, accompanied by an increase in the mycelial mass. The inhibition of pellet formation by BC would be due to the cancellation of excessive of  $Mg^{2+}$  and some other metal cations in the broth. EDTA inhibited pellet formation, but never stimulated growth. Also EDTA suppressed the inhibitory and stimulatory action of BC.

Key words : *S. azureus*, pellet formation, divalent cations, chelators



日本農芸化学会西日本・関西支部合同大会（佐賀） 10月、1997年

*Streptomyces azureus* の *minDSA* 遺伝子の構造と機能解析

○酒見博士、西山孝、土居克実、緒方靖哉（九大農・遺資研）

【目的】 *S. azureus* ATCC14921 のプラスミド非保持株 PK100C の染色体ライブラリーより分離した断片中に、*B. subtilis* のセプタ形成に関与する *minD* 遺伝子産物の N 末端領域と相同性が認められる *orf489* を検出した。本 *orf* 産物は *S. azureus* の形態分化への関与が推定されたが、不完全長であり、その機能も不明であった。本研究では、放線菌の *minD* 様遺伝子と推測される *orf489* の構造と機能の解明を目的とした。

【方法と結果】 *orf489* を含む 531bp 断片をプローブとして、PK100C 株の染色体から完全な *minD* 様遺伝子をクローニングした。本遺伝子 (*minDSA*) は 783bp からなり、推定遺伝子産物は MinD と 22% の Identity を示した。さらに、ハイブリダイゼーションにより本遺伝子と相同な遺伝子が多数の *Streptomyces* 属放線菌に存在することも明らかになった。現在、形質転換による *minDSA* の形態分化への関与を検討し、また、他の *Streptomyces* 属株からの *minD* 様遺伝子のクローニングを試みた。

日本農芸化学会西日本・関西支部合同大会（佐賀） 10月、1997年

サイレージ乳酸菌のプラスミド pLKS の性状解析

○江口智子、土居克実、田中治\*、大桃定洋\*、緒方靖哉

（九大農・遺資研、農林水産省）

【目的】 サイレージ発酵性 *L. plantarum* NGRI0101 株から分離したファージ耐性に関与するプラスミド pLKS (2051bp) の複製様式を中心に性状の解析を試みた。

【方法及び結果】 pLKS の *rep* の塩基配列が  $\theta$  型複製を行う乳酸菌プラスミド pUCL287 の *rep* と非常に高い相同性を示したこと、および NGRI0101 株の全 DNA について行ったアルカリ未処理のハイブリダイゼーションの結果とから、pLKS は  $\theta$  型複製を行うことが推定された。また、本プラスミドと pUC119 とを連結した組換えプラスミド pUCLS は *L. pentosus* で複製した。本 pUCLS を用いて、pLKS のファージ耐性機構の解明と、大腸菌-乳酸菌シャトルベクターの開発を行っている。

## 微生物機能の開発と利用

九州大学農学部附属遺伝子資源開発研究センター微生物遺伝子開発分野 緒方 靖 哉

微生物は、動植物細胞に比べて極めて生育速度が早く、簡単な培地で大量培養が可能であり、さらに種類が多種多様で、その機能が多岐にわたり、また育種改良が容易であることなど、遺伝子資源として或いは物質生産の手段として優れた特性を持っている。微生物機能の開発は、微生物の潜在機能を期待して、目的とする能力を持つ微生物をスクリーニングすることからはじまる。スクリーニングによって見出された菌株が生産等に利用されるまでには、その機能向上のため、交配、突然変異、細胞融合、遺伝子組換えなどの遺伝子操作による菌株改良が行われる。併せて、微生物反応の最適環境制御も実用化にとって極めて重要である。本講では、当教室で現在取り組んでいる微生物機能及び遺伝子機能の開発に関する研究の3例を紹介する。

### 1. サイレージ乳酸菌の機能開発

本研究は、農林水産省草地試験場と共同で、高温多湿型の気候に適した西南暖地型の高機能性サイレーシ乳酸菌の作出を目的としており、まず沖縄県を中心に西南暖地のサイレーシより高温耐性・高乳酸生産性を示す乳酸菌約 80 株を分離した。次に、目的に適した菌株を選択するために開発構築したパウチ法（小規模の、均一サイレーシ発酵モデル系）を利用して発酵試験を行い、耐酸性・乳酸発酵性に優れた菌株や乳酸を速やかに生成しかつ増殖性に優れた菌株を選出した。これらの菌株の混合接種は発酵品質向上に有効であることが認められた。また、菌株分離の過程で、多くのサイレーシに、ファージ（細菌ウイルス）汚染や腐生性菌の繁殖による発酵品質の劣化或いは施肥による硝酸体窒素の過剰蓄積が起こっていることが認められた。これらの問題の対策として、分離した菌株に遺伝子操作により、さらに高乳酸生産性、ファージ耐性、硝酸分解性等の機能を付加した高機能性サイレーシ調製用優良株の育種を検討している。

### 2. 好熱性細菌の活動制御及び機能開発

本研究は、本工学部資源工学科と共同で、地熱発電所で起こるシリカ沈殿物形成の制御技術の開発を目的としてはじめた。まず、シリカ沈殿物（シリカスケール）の生成量とこれに含まれる DNA 量が比例して増加することを明らかにし、高熱水中でのシリカスケール形成における微生物の関わりをはじめて実証した。次いで、スケールから抽出した DNA から得た 16S rRNA 遺伝子について塩基配列を決定し、スケール中の微生物相を解析する方法を設定すると共に、人工熱水培地を用いる *in vitro* 実験系で、分離した高度好熱性菌株によるシリカスケール“バイオシリカ”の生成に成功した。シリカスケール形成過程における好熱細菌の役割と作用機構の解明及び微生物作用の制御の面からのスケール沈着防止法の開発と実用化を目指している次第を述べる。また、分離された多数の好熱性菌株と抽出 DNA の遺伝子資源としての有用性は計りしれなく、利用開発について言及する。

### 3. 放線菌の未知遺伝子機能の開発

飼料添加用の抗生物質チオストレプトン生産菌 *Streptomyces azureus* は固体培地上で増殖する際に、菌叢に接合性プラスミドの関与す *pock* と呼ばれる穴あき状の生育阻害斑を生じる。本現象の解明過程で見出した下記のプラスミドの遺伝子及び分化に関わる染色体遺伝子等の構造と機能、さらにこれらの遺伝子機能開発への展開について言及する。

#### a. プラスミド遺伝子

*spi* : 孢子形成阻害遺伝子並びにプラスミド伝達遺伝子 ; *impSA* と組みで遺伝子  
*impSA* : *spi* 転写調節遺伝子 ; 発現制御オペロンの開発  
*attP, int, xis* : プラスミドの宿主染色体への部位特異的組込み関与の遺伝子群 ; 組込みベクターの開発

#### b. *Streptomyces azureus* 染色体遺伝子

*spoIIIESA* : 染色体 DNA 転移・分配に機能する遺伝子 ; 細胞増殖の制御に利用  
*minDSA* : 隔壁形成関与遺伝子 ; 増殖促進並びにペレット形成抑制に利用  
*pspSA* : 代謝制御遺伝子 ; 抗生物質等の二次代謝産物の生産の制御に利用

## サイレージ乳酸菌の機能開発

土居克実、江口智子、秋好直樹、稲垣史生、藤尾雄策、緒方靖哉（九大・農）  
田中治、大桃定洋（農水省）

西南暖地型気候に適応したサイレージ乳酸菌の開発を目的とし、西日本および沖縄地方から 80 株の NGRI 株を分離した。これらの菌株には優れた高温適応性、高乳酸発酵性、耐酸性などのサイレージスターターとしての有用性が認められた。我々は、これらの NGRI 株の中から特に有用形質を示す数株について機能の開発を行い、また、他菌株の有用形質をこれらの菌株に導入することを試みている。

### (1) ファージ耐性プラスミド pLKS の構造・機能解析と利用

まず、サイレージ調製の際に発酵品質への悪影響を及ぼすファージ汚染の防止または軽減化を目指し、ファージ耐性を示す *L. plantarum* NGRI0101 株からプラスミド pLKS を分離した。本プラスミドの塩基配列を決定し、ORF の解析を行ったところ、他の乳酸菌プラスミドの間には *rep* 遺伝子以外に有意な相同性は認められず、また、ファージ耐性に関与する遺伝子と考えられるものは見いだせなかった。従って、本プラスミドのファージ耐性は pLKS の Rep によるファージ DNA 複製阻害に依ると推察した。次に、複製様式を検討したところ、pLKS は  $\theta$  型複製を行うことが分かった。また、pLKS を用いたシャトルベクターの構築を試み、エリスロマイシン存在下で安定に保持される pUCLSEm が得られた。

### (2) 乳酸代謝経路上の PFK をコードする遺伝子の構造・機能解析

Phosphofructokinase(PFK)は乳酸代謝経路の Key Enzyme の一つである。本酵素の活性と高乳酸生産性や高増殖能との関連性を明らかにするため、高乳酸生産株や増殖能の優れた NGRI 株から PFK を抽出し、その活性を調べたところ、有意な差が認められた。そこで、*pfk* を *L. plantarum* IFO3070 よりクローニングし、得られた塩基配列を基に PFK 保存領域を増幅する PCR を行ったところ、*L. plantarum* や近縁種である *L. pentosus* 以外の菌株の DNA では増幅が認められず、本法は *L. plantarum* および *L. pentosus* と他菌種との簡便な同定にも利用できると考えられる。また、増幅した *pfk* 部分断片の塩基配列の比較を行い、有用形質との関連を検討している。

### (3) サイレージ乳酸菌への硝酸分解能の付加

飼料作物中に多量に含有される  $\text{NO}_3^-$  が家畜に中毒を招く危険性が指摘されている。本研究では、サイレージ乳酸菌に硝酸分解能を賦与し、 $\text{NO}_3^-$  態窒素をサイレージ発酵過程で微生物的に軽減化することを目的としている。まず、コンポストおよびサイレージ中から硝酸分解菌を分離し、硝酸、亜硝酸分解能を評価した。その結果、優良な増殖能および硝酸還元能を有する No. 161 株を選出した。本株は形態や生理学的特性、16SrDNA の部分配列の結果から、*B. licheniformis* に近縁であることが判った。また、硝酸還元酵素オペロンの一部である *narH* 遺伝子の部分増幅を行い、これをプローブとしたサザンハイブリダイゼーションを行い、本遺伝子がサイレージ乳酸菌には座乗していないことが示された。現在、*narH* 部分増幅断片を用いて、硝酸還元酵素遺伝子のクローニングを行っている。一方、併せてサイレージ発酵における硝酸分解菌や硝酸還元酵素の利用の有意性を検討している。

接合性放線菌プラスミドのDNA転移及び複製との関連性の究明  
DNA Translocation and Its Relation to the Replication of  
Conjugative Plasmids in *Streptomyces*

九州大学・農学部 緒方 靖哉

《目的》

放線菌の接合性プラスミドは複製を伴いながら細胞間を自己伝達する。このDNA転移には transfer 遺伝子 (*tra*) が関与する。本研究では、チオストレプトン (TS) 生産菌から分離した環状と線状の性質の異なる2種類の接合性プラスミドを用いて、両者の *tra* の機能を中心に、DNA転移、複製およびこれらに関わる現象を究明する。

《結果》

*S. azureus* ATCC14921 由来の接合性プラスミド pSA1.1 (9.1kb, 図1) の複製に関与する因子および複製機構を、宿主菌株に *S. lividans* TK24 を用いて追究し、pSA1.1は複製中間体として1本鎖DNAを蓄積する  $\sigma$  型の複製を行い、本複製には、pC194型の複製開始点 *ori* およびスーパーファミリー-Iに属する *rep* 遺伝子 (1379bp) 産物の複製開始タンパク質 Rep が関与することを明らかにした (図2, 3)。また、*rep* の発現を制御すると推定される *pra* 遺伝子を同定した (図1)。pSA1.1の *ori* と *rep* の間には、溶原性バクテリオファージにも見られる特性である組込み遺伝子 *int*, *xis* 等が挿入されているのが認められた。

一方、pSA1.1の複製に関与する宿主側の推定因子として、塩基性・低分子量 (分子量約1万、等電点9.7以上) の1本鎖DNA結合性のヒストン様タンパク質 Hs1 を分離した。さらに、これをコードする遺伝子 *hup* を *S. lividans* の染色体からクローニングした (図4)。系統解析から、Hs1は多くの細菌由来のヒストン様タンパク質とは系統的に離れ、枯草菌のバクテリオファージ SP01 の TF1 に近縁する特異性を持っていた (図5)。また、Hs1はpSA1.1の複製中間体である1本鎖DNAに結合するばかりでなく、細胞間転移の際の1本鎖DNAにも結合すると推察された (図6)。

pSA1.1では孢子形成阻害遺伝子として同定した *spi* が接合伝達に必要な *tra* 遺伝子であり (図1)、*spi* 遺伝子産物は、図7に示すタンパク質と共通のモチーフを持ち、接合伝達の際に膜貫通を伴うDNA転移に機能している。上流にある *impSA* は致死に作用する *spi* のレプレッサーとして働き、*impSB* の機能は *impSA* 産物が *spi* プロモーターへ結合するのを促進すると推定された。また、この *spi-impSA* が pSA1.1 の *kil-kor* システムと考えられた。*spi* をプローブとしたサザン法により、染色体DNA転移に機能する *spoIII E* 様遺伝子が *S. azureus* を含む多くの放線菌染色体上に存在することを確認し、*spi* の孢子形成阻害は、孢子形成に必要な *spoIII E* 様遺伝子産物の作用に及ぼす拮抗阻害であると推察した (図6)。

*S. laurentii* ATCC31255 は、pSA1.1類似の性状を持つ環状 pSLS (16kb) と strand-displacement 型の複製を行う線状 pSLL (93kb) を保有するが、pSLL が脱落すると、pSLS の染色体組込み配列が自律化する。この pSLL が脱落した pSLS の多コピー保有株は、孢子着生および TS 生産性が著しく抑制された。本菌株に pSLL を接合導入させると、正常の孢子着生性および TS 生産性に返ることが明らかになった。これは、pSLL には pSLS の染色体からの自律化並びに pSLS の宿主生育阻害を抑制する機能があることを示している。

### III. センターの活動状況

#### 1. 教育活動

##### 家蚕遺伝子開発分野

##### 課程博士学位取得者

大城戸 利久

Esterases in hemolymph and silk gland of the silkworm, *Bombyx mori*

##### 研究生

甲斐 浩臣

RFLP利用によるカイコの連関地図作成

友井 祐史

カイコの体液キモトリプシンインヒビターの遺伝子解析

##### 訪問教授・研究員

鍾 伯雄（中国浙江農業大学 助教授）

カイコの品種分化と遺伝子資源に関する研究

T. Pavan Kumar（インド、NSSPディレクター）

カイコ遺伝子資源の管理法の研修

Kostas Iatro（カナダDepartment of Medical Biochemistry, University of Calgary, 教授）

カイコ遺伝子資源保存の見学とセミナー開催

H. Eichenbuch（米国、University of Rochester, Department of Biology 教授）

カイコ遺伝子資源保存の見学とセミナー開催

宋 方洲（中国西南農業大学 副教授）

既知連関群とRFLP連関群及び染色体地図の統合に関する研究

姜 永煌（中国浙江農業大学 助手）

カイコ消化液35kプロテアーゼに関する研究

趙 萍（中国四川省蚕桑研究所 研究員）

家蚕の体液タンパク質に関する研究

##### 植物遺伝子開発分野

##### 大学院農学研究科（修士課程）

浅川今日子 イネのアミロペクチンに関する突然変異体の遺伝学的解析  
大塚礼子 イネ種子貯蔵タンパク質26kDaグロブリンに関する遺伝学的研究  
田懐東 イネ種子貯蔵タンパク質57-H突然変異に関する遺伝学的研究

#### 大学院農学研究科（博士課程）

上村祐二 イネ種子貯蔵タンパク質グルテリンに関する遺伝・育種学研究  
Jo Yoo-hyun イネ種子貯蔵タンパク質プロラミンの遺伝・育種学的研究  
竹本陽子 イネ種子貯蔵タンパク質グルテリンの生合成・集積過程を制御する遺伝子に関する研究  
曲楽慶 イネグルテリン変異体に関する遺伝学的研究  
西愛子 イネ種子胚乳デンプンの糊化特性に関する研究  
松坂弘明 イネ種子貯蔵タンパク質プロラミンの生合成集積過程における遺伝的調節機構の解析  
山下和宏 イネ胚乳デンプンに関する遺伝・育種学的研究

#### 外国人研究生

Sadar Uddin Siddiqui  
パキスタンイネの遺伝子資源学的研究

#### 訪問教授・研究員

洪 徳林 (Hon De Lin) (中華人民共和国 南京農業大学 副教授)  
中国雑交稲の品種改良に関する研究  
李 錫榮 (Sok-Young Lee) (大韓民国 農村振興庁農業科学技術院 農業研究士)  
韓、日、中在来水稻品種の遺伝資源学的研究

#### 微生物遺伝子開発分野

#### 大学院農学研究科（修士課程）

秋好 直樹 硝酸還元酵素生産菌の同定および酵素遺伝子のクローニング  
牛島 雄毅 カイコによるHIV-1 gp120の大量生産  
小山 直子 昆虫細胞で発現したHIV-1 gp120の精製  
白上 知幸 *Streptomyces laurentii* プラスミドの宿主生育阻害作用  
塚越 有紀 *Streptomyces* 属放線菌のDNA分配に機能する遺伝子の構造と

### 機能解析

- 福嶋 順子 *Streptomyces azureus* の孢子着色に関与する遺伝子の解析  
江口 智子 サイレージ乳酸菌のファージ耐性プラスミドpLKSに関する研究  
酒見 博士 *Streptomyces azureus*の形態形成遺伝子*minDSA*の構造と機能に関する研究  
松崎 友美 *Streptomyces azureus*のpock形成プラスミドpSA1.1のrepおよびoriの同定と機能解析  
山田 修司 *Streptomyces azureus*のpock 形成に関連する*spoIIIE*様遺伝子およびSA12ファージ  
和田 将幸 バキュロウイルス-昆虫細胞によるHIV-1gp120の発現

### 大学院農学研究科（博士課程）

- 稲垣 史生 地熱水中のシリカスケール形成に関与する微生物の解析と機能開発  
西山 孝 放線菌の形態分化と二次代謝の多面形質発現に機能する遺伝子の解析  
Okba Adel Kamal Effect of bacitracin on the growth and pock formation in *Streptomyces azureus*  
Fan Guiwen 高機能性サイレージ乳酸菌の作出と育種に関する研究  
樽井 寛 昆虫機能を利用した無細胞蛋白質合成に関する研究  
横山 英之 *Streptomyces* プラスミドpSA1.1の複製機構に関する研究

### 課程博士学位取得者

- 横山 英之 *Streptomyces* プラスミドpSA1.1の複製機構に関する研究

### 外国人研究生

- 崔 聖賢（大韓民国 忠南大学）  
無塩発酵大豆に関する研究

### 受託研究生

- 瀬畑 環（タカノフーズ）  
ポリアミノ酸発酵に関する研究  
龍 豪（ふくや）

ポリグルタミン酸架橋体の合成に関する研究

**研究生**

村田 匡礼 昆虫細胞を利用した無細胞蛋白質合成系に関する研究

**2. 科研・共同・受託研究**

**家蚕遺伝子開発分野**

基盤研究 (A) 研究分担 藤井 博、伴野 豊

「カイコの祖先型昆虫に関する生物学的研究」

基盤研究 (A) 研究分担 伴野 豊

「新たな育種法としての染色体ベクターの開発」

基盤研究 (A) 研究分担 藤井 博、伴野 豊

「カイコの胚発生・後胚子発生における構成遺伝子と特殊遺伝子の差時的発現制御機構」

国際学術研究 研究代表 藤井 博

「既知連関群とRFLP連関群及び染色体地図の統合に関する研究」

国際学術研究 研究分担 伴野 豊

「カイコの起源とその品種分化に関する遺伝学的研究」

東京大学大学院重点特別経費 研究分担 伴野 豊

**植物遺伝子開発分野**

基盤研究 (B) 研究代表 佐藤 光

「イネのアミロペクチン変異体の遺伝・育種学的解析」

基盤研究 (A) 研究分担 佐藤 光

「種子作物中の生理作用物質含量を調節する育種技術」



農林水産省農業生物資源研究所環境応答研究室 中村保典  
「イネのアミロペクチン変異体の特性解析」

ワシントン州立大学 Dr. Tomas Okita

「イネ種子貯蔵タンパク質グルテリンの生合成・集積過程を制御する遺伝子に関する研究」

(株)レオロジー機能食品研究所

「血液レオロジー機能向上に及ぼすコメタンパク質の影響とコメタンパク質の遺伝的変異の探索」

(株)アレルゲンフリーテクノロジー研究所

「米アレルゲンの低減化に関する研究」

微生物遺伝子開発分野

基盤研究 (A) 研究代表 緒方 靖哉、分担 土居 克実

「高機能サイレージ乳酸菌の機能増強と実用化に関する研究」

基盤研究 (B) 研究代表 緒方 靖哉、分担 土居 克実

「バイオテクノロジーにおける法と作法」

基盤研究 (B) 研究代表 緒方 靖哉

「放線菌の孢子形成における膜貫通を介したDNA転移機構」

国際学術研究 研究分担 緒方 靖哉、土居 克実

「地熱環境における微生物活動とシリカ沈殿」

国際学術研究 研究分担 緒方 靖哉

「C1化合物に特異的な新規結晶酵素の構造と反応機構」

### 3. 講演会・セミナー・講習会

## 植物遺伝子開発分野

1998年3月19日

洪 徳林（南京農業大学農学系副教授）

「中国の長江地域におけるジャポニカ型ハイブリッドライス研究の現状」

## 微生物遺伝子開発分野

1997年6月12日

大桃 定洋（農林水産省畜産試験場 主任研究員）

「乳酸菌のバクテリオシン」

1998年2月20日

廣田 洋二郎（(財)工業所有権協力センター (IPPCC) 主査）

「特許業務にたずさわって」

1998年3月26日

富田 房男（北海道大学農学部 教授）

「微生物によるオリゴ糖の生産」

## 4. 海外渡航

### 家蚕遺伝子開発分野

藤井 博、国分 次雄

中華人民共和国（西南農業大学及び浙江農業大学）

1997年9月22日～1997年10月2日

文部省科学研究費補助金 国際学術研究：大学間協力研究「既知連関群とRFLP連関群及び染色体地図の統合に関する研究」の打ち合わせならびに家蚕遺伝子系統の特性調査

藤井 博、伴野 豊

連合王国

文部省在外研究員 8 創造開発研究派遣

1997年12月1日～1997年12月14日

遺伝子資源の効率的評価法の調査

伴野 豊

中華人民共和国（浙江農業大学）

1997年6月2日～1997年6月8日

文部省科学研究費補助金 国際学術研究：学術調査「カイコの起源とその品種分化に関する遺伝学的研究」

伴野 豊

大韓民国（蚕糸昆虫研究所・ソウル大学）

1997年9月16日～1997年9月20日

文部省科学研究費補助金 国際学術研究：学術調査「カイコの起源とその品種分化に関する遺伝学的研究」

植物遺伝子開発分野

佐藤 光

バングラデシュ（バングラデシュ農業大学院）

平成9年7月14日～8月7日

バングラデシュ農業大学院アフターケア評価並びに植物遺伝資源データベース作成の技術移転

熊丸 敏博

連合王国（王立キュー植物園、ジョインネス研究所、ロングアシュトン試験場）

平成9年12月1日～12月27日

遺伝子資源の効率的評価法の調査

外国人来訪者

Dr. Helmut Knuepffer （ドイツ連邦共和国：Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben ）

平成10年3月18日

植物遺伝資源の保存と管理に関する討議と意見交換

#### 微生物遺伝子開発分野

緒方 靖哉、土居 克実

中華人民共和国（北京）

1997年5月26日～6月1日

第10回国際放線菌生物学会議出席および形態分化に関する研究打ち合わせ

緒方 靖哉

アメリカ合衆国 ワイオミング州（イエローストン）、ネバダ州（ステイームポートスプリング）

1997年9月5日～17日

スタンフォード大学地質学科との共同で「微生物活動とシリカ沈殿」に関する調査と試料採集、並びに研究打ち合わせ

緒方 靖哉

オランダ（アムステルダム大学）、フランス（ピエール・マリー・キュリー大学）、連合王国（インペリアルカレッジ）

1997年11月21日～12月6日

C1微生物に特異的酵素に関する共同研究打ち合わせ

原 敏夫

連合王国（王立キュー植物園、ロンドン大学Imperial College School of Medicine、ローザムステッド試験場）

1997年12月4日～1998年1月12日

遺伝子資源の効率的評価法の調査

#### 外国人来訪者

Dr. Donald R. Lowe（スタンフォード大学地質学科 教授）

平成9年8月25日～8月30日

地熱環境における微生物活動とシリカの沈殿に関する共同調査、研究打ち合わせ

#### IV. 遺伝子資源系統の保存・管理

##### 遺伝子資源系統の分譲・収集

###### 家蚕遺伝子開発分野

本センター保存のカイコの系統は遺伝学を中心とする研究のための実験生物として蒐集されているものである。保存系統はまずその主要目的形質によってアルファベットで分類し、それに2位数を附し系統番号としている（同一起源の分枝系は3位数）。分類記号の内容及び1998年時における記号別保有数は以下の如くである。

p (地域型品種)	1 8	a (胚子, 幼虫期致死)	1 8
b (繭形・繭質)	1 7	c (繭色)	2 6
d (卵形・卵殻色)	3 0	e (卵色)	2 8
f (幼虫肢・斑紋)	3 7	g (幼虫斑紋)	1 6
i (幼虫眼紋・頭尾斑)	1 3	k (幼虫体色)	2 3
l (幼虫体色)	2 8	m (モザイク・畸形)	1 6
n (幼虫体形)	2 6	o (油蚕)	3 5
r (染色体異常・交叉率)	1 5	t (発育・眠性)	2 2
u (蛹・成虫)	2 0	w (連関分析用合成系)	2 7
x (分析未了の新突然変異)	1 3		

このほか淘汰育成中のもの並びに各種実験系があるが、これらは大文字の記号を用いて区別しており、ここには記載しない。以下、各保存系統について解明された遺伝情報のほか、交配形式、起源及び導入元・発見・交雑の年次など主要な必要事項を記載する。蛋白質、酵素、染色体組成に関する情報の多くは本研究班によって解明されたものである。記載様式は系統番号、交配形式（染色体構成）、卵・幼虫・繭・蛹・成虫の遺伝形質、備考として起源・品種・交雑系統及び主要形質の誘発処理源、入手先、年次の順であるが、特記事項のない項目については省略する。また、例えば *w-3oe* では白卵、幼虫皮膚透明（油蚕）、蛹・成虫の複眼白色、と種々の発育段階で変異形質を発現するが、このような場合には“卵”の項にのみ記載している。交雑によりはじめて認知され得る形質、蛋白質・酵素等の多型、未淘汰の混在系、致死性により正常を常に分離するもの、等については（ ）内に記号+記入し、特殊形質を標識するための計画的分離形質は&で併記している。また、*L*、*ms* 等については発現環節番号を（ ）

内に示す。尚、交雑系統は原則として現番号で表示し、現有しないものについては品種名或いは大文字の記号を用いた。他機関からの受入系統は主形質の起源を能う限り記したが、出現から導入までの経緯は定かでない。例えばa80系統〔起源 春月系（カネボウ, ×w31×w32×190, 1985年）〕はカネボウから春月系交雑種に生じた*l-h*を分離する系の分譲を受け、これに本センターでw31, w32さらに190系統を1985年に交雑し*Xan*を標識形質として導入した育成系統であることを示す。遺伝子情報の概要は「家蚕遺伝子資源系統の特性情報増補第2版—1998—Genetical stocks and mutations of *Bombyx mori*: important genetic resources」に記載している。

（分譲）

小林正彦 東京大学農学部教授（学部長）

e 80	<i>l-n (+)</i>	2 蛾	発生学的研究
e 81	<i>l-nh (+)</i> "		"
l 22	<i>pM Y, C</i> "		連関分析
l 27	<i>pM Y, +C</i>	"	"
t 32	<i>pnd-2 (+)</i> "		発生学的研究

村上昭雄 国立遺伝学研究所助教授

b 40	<i>Nd</i>	2 蛾	生態遺伝学的研究
b 41	<i>Nd</i>	"	"

上野孝治 国立基礎生物学研究所助教授

f 12	<i>EN</i>	2 蛾	発生学的研究
------	-----------	-----	--------

紫藤光一 熊本県立氷川高等学校教諭

p22	<i>p3</i>	5 蛾	生物学解剖及び生理学
-----	-----------	-----	------------

古沢壽治 京都工芸繊維大学繊維学部教授

w05 *pe re otm*, p22 *p3*, t91 *p3 ch pe re Sph* 各3蛾  
 発生・分化に及ぼす宇宙放射線の影響に関する研究

国立感染症研究所 土田耕三主任研究員

<i>p3 Y, +C</i>	生化学的研究
-----------------	--------

藤原晴彦 東京大学大学院理学系研究科助教授

*u01 p3 Vg, u02 p rw, u04 p flk, u05 p3 fln* 各 3 蛾

カイコ変態時の翅形成の分子生物学的研究

兵庫県立教育研修所 橋本光政主任指導主事

交雑種, 実験観察・遺伝の交配実験材料

韓国慶北大学天然繊維科 盧 時 甲 副教授

*p20 p3, p22 p3, p44 p, p62p, b31 p3, d18 p* 各 2 蛾

系統分化及び発生分化に関する研究

京都工芸繊維大学繊維学部 古沢壽治教授

*w05 pe re otm, t 10p rt Amy-dIV, t 01 p1(p3) oc mod Amy-dn*

*f11 p3EDI* 各 3 蛾

発生・分化に及ぼす宇宙放射線の影響に関する研究

アリゾナ大学 Michael A Wells 教授

*FL-1 p3 Y;lal x p+;++* 定期的に発送

カロチノイドの生化学的研究 (共同研究)

### (収集)

中国 浙江農業大学 徐 孟 奎教授

白卵かつ蛾の眼色正常色 4 蛾区

JICA 岩田 益 専門家

メキシコカホーノス州保存種 2 蛾区

### 植物遺伝子開発分野

植物遺伝子開発分野におけるイネの遺伝子資源の収集と保存は、加藤茂包教授が当時の農林省農事試験場畿内支場に収集されていた水稻品種を九州大学に移したことに始まる。1921年の九州大学農学部開設に際し安藤広太郎教授、加藤茂包教授をはじめ

当時の農事試験場のイネ学の第一線の研究者が招聘され、イネに関する様々な研究を開始した。加藤教授は研究開始当初から我國のイネの品種改良における遺伝子資源の重要性を説き、内外のイネ品種の積極的収集と保存を進め、大戦前にはすでに1,300点以上に達していた。イネの系統保存事業は農学第一（育種学）講座の盛永俊太郎、永松土巳、片山平、大村武の歴代の教授に継承され、1997年発足した遺伝子資源開発研究センター・植物遺伝子開発分野へ引き継がれ今日に至っている。1955年以降、イネの系統保存に対して文部省から特別予算措置が講ぜられた。

このように、本センターのイネの系統保存事業は九州大学農学部開設当初からイネの品種改良における遺伝子資源の開発と評価の重要性を洞見して行われてきたものである。これらのイネ品種・系統を用いて、ジャポニカ・インディカ品種の亜種的分化の発見やハイブリッドライス作出に必要な細胞質雄性不稔性の発見など先駆的研究が行われ、これらの成果はイネに関する基礎的、応用的研究に大きく貢献している。現在保存している品種系統の分類基準とその数を以下に示す。

HO系統	国内外の品種系統	1,398 系統
LO系統	1962-1965年収集したわが国在来品種	1,341 系統
TAL系統	中国在来品種・系統	476 系統
IBP系統	FAO 国際共同研究供試品種	276 系統
R系統	Lo系統と同時期に収集した県奨励品種	515 系統
UP系統	国内外の陸稲品種	342 系統
A系統	長崎原爆被曝再生株より採種した系統	100 系統
FL系統	標識遺伝子系統	838 系統
RT系統	転座系統	331 系統
T系統	三染色体植物系統	44 系統
M系統	放射線照射突然変異系統	178 系統
CM系統	化学変異源処理突然変異系統	3,471 系統
EM系統	胚乳形質に関する突然変異系統	902 系統
計		10,202 系統

これらに加え、半数体、3倍体、4倍体等の倍数体系統、アフリカイネ(*Oryza glaberrima* Steud.)などを保存し、総保存系統数は既に1万点を越えている。さらに、近年アフリカや東南アジア諸地域への探索と世界各地の研究者との交流を通して、新たな品種・系統の導入を行っている。また、突然変異誘起処理によって新たな変異系統の作



出もを行っている。

### 遺伝子資源系統の導入と分譲

植物遺伝子開発分野では遺伝子資源研究センター設立以来、文部省科学研究費補助金海外学術調査の補助を得て1988年マダガスカル、タンザニアのアフリカ2カ国、1991年にはネパールおよびブータンのアジア2カ国への探索を行い、多数の品種・系統を導入してきた。この2年間でも、パキスタンなど国内外の研究者との交流を通して、品種・系統の導入と分譲を活発に行っている。また、日本型品種ばかりでなく、印度型品種を用いて印数品種を用いて引き続きMNU受精卵処理を行い、新たな遺伝子資源の開発に努めている。

年次	開発系統	導入(件数-系統数)		分譲(件数-系統数)	
		国内	国外	国内	国外
1997	145	1-201	2- 41	6-2,734	1- 4

### 微生物遺伝子開発分野

微生物遺伝子開発分野における菌株の収集と保存は、発酵学講座、微生物工学講座など応用微生物関連講座での有用微生物の探索とその研究過程で得られた分離株及び変異株の収集・保存に始まる。これら菌株の多くはアルコール、有機酸、アミノ酸、核酸、抗生物質、酵素等の発酵、食品、医薬、化学工業にまたがる広範囲の各種有用物質の生産に利用されている。また、産業廃棄物の処理と資源化、炭酸ガス処理を含む地球環境の改善に係わる環境科学の基礎的・応用的研究にも大きく貢献している。

現在、以下のような菌株を保存している。

#### I. 細菌

- (A) 基準株 *Bacillus*属、*Cellulomonas*属、*Lactobacillus*属、*Lactococcus*属、*Pseudomonas*属、*Thermus*属および大腸菌 41種78株
- (B) 分離株 *Bacillus*属、*Lactobacillus*属、*Lactococcus*属、*Pediococcus*属、*Pseudomonas*属および*Thermus*属 12種655株
- (C) 変異株 *Bacillus*属、*Lactobacillus*属および*Thermus*属 8種21株

## II. 放線菌

- (A) 基準株 *Micromonospora*属、*Nocardia*属、*Rodococcus*属、*Streptomyces*属  
および*Streptoverticillium*属 151種163株
- (B) 分離株 *Streptomyces*属 5種5株
- (C) 変異株 *Streptomyces*属 8種210株

## III. プラスミド

- (A) 導入プラスミドベクター 大腸菌、枯草菌（含む納豆菌）、乳酸菌、  
放線菌および酵母系統 75種類
- (B) 分離プラスミド 枯草菌（含む納豆菌）、乳酸菌および放線菌系統  
82種類
- (C) 変異・構築プラスミド 3000種類以上

## IV. ファージ

- (A) 導入ファージ・ファージベクター 大腸菌、乳酸菌、放線菌系統  
18種類
- (B) 分離ファージ 乳酸菌および放線菌系統 115種類
- (C) 変異・構築ファージ 大腸菌、乳酸菌および放線菌系統 32種類

## V. 糸状菌

- (A) 基準株 *Aspergillus*属、*Mucor*属および*Penicillium*属 3種25株

## VI. 酵母

- (A) 基準株 *Saccharomyces*属および*Candida*属 3種3株

## VII. 昆虫培養細胞

*Bombyx*属、*Spodoptera*属及び*Trichoplusia*属 7種11株

## VII. 昆虫ウイルス及び組換え体

- (A) 昆虫ウイルス 5種類
- (B) 組換え体ウイルス 6種類

上記以外の有用微生物資源については、現在、発酵学教室及び微生物工学教室にお

いてそれぞれ保存・管理されている。

(分譲)

大阪大学工学部 仁平 卓也 助教授

*Streptomyces azureus* PK100株、PK100C株

Dr. Jose A. Gil

Dept. Microbiologia, Facultad de Biología, Universidad de León, 24071 León, Spain

*minD* of *Streptomyces azureus*

九州大学歯学部 中山 宏明教授

*Thermus aquaticus* YT-1 ATCC25104、*T. flavus* AT-62、*T. thermophilus* HB8、

*T. sp* strain TMY、*T. sp* strain TMW

(導入)

ATCC (American Type Culuture Collection )

*Thermus aquaticus* YT-1 ATCC25104

*T. flavus* AT-62 ATCC33923

*T. thermophilus* HB8 ATCC27634

東京薬科大学 大島 泰郎 教授

*T. flavus* AT-62

*T. thermophilus* HB8

## V. センター規程

### 九州大学農学部附属遺伝子資源開発研究センター規程

(趣旨)

第一条 この規程は、九州大学農学部附属遺伝子資源研究センター（以下「センター」という。）の組織及び運営に関し必要な事項を定める。

(センターの目的)

第二条 センターは、遺伝子の保存、開発及び利用に関する研究を行うことを目的とする。

(分野)

第三条 センターに、次の分野を置く。

- 一 家蚕遺伝子開発分野
- 二 植物遺伝子開発分野
- 三 微生物遺伝子開発分野

(センターの長)

第四条 センターに長を置き、農学部の責任及び兼任の教授のうちから教授会の議を経て選定する。

- 2 センターの長は、センターの管理及び運営を総括する。
- 3 センターの長の任期は、二年とする。
- 4 センター長は、再任されることができる。

(運営委員会)

第五条 センターの管理運営に関する重要な事項を審議するため、遺伝子資源開発センター運営委員会（以下「運営委員会」という。）を置く。

第六条 運営委員会は、委員長及び次の各号に掲げる委員をもって組織する。

- 一 センターの専任の教官のうちから選ばれた者三人
- 二 農学科、農芸化学科、林学科及び食糧化学工学科の専任の教授及び助教授のうちから選ばれた者各一人
- 三 前二号に掲げる者以外の農学科の専任の教授、助教授及び講師のうちから選ばれた者一人
- 四 農学部附属農場及び演習林の専任の教授及び助教授のうちから選ばれた者各一人
- 五 農学研究科遺伝子資源工学専攻の専任の教授及び助教授のうちから選ばれた

者一人

- 2 委員の任期は、二年とする。ただし、委員に欠員が生じた場合の後任者の任期は、前任者の残任期間とする。
- 3 委員は、再任されることができる。
- 4 委員は、農学部長が委嘱する。

第七条 委員長は、センターの長をもって充てる。

- 2 委員長は、運営委員会を召集し、その議長となる。
- 3 委員長に事故等があるときは、あらかじめ委員長の指名する委員がその職務を代行する。

第八条 運営委員会は、委員の過半数の出席がなければ、議事を開き、議決をすることができない。

- 2 運営委員会の議事は、出席した委員の過半数をもって決し、可否同数のときは、議長の決するところによる。

(雑則)

第九条 この規程に定めるもののほか、センターの管理運営に関し必要な事項は、運営委員会の議を経て、センターの長が定める。

附則

- 1 この規程は、平成九年四月一日から施行し、平成九年四月十六日から適用する。
- 2 九州大学農学部附属遺伝子資源研究センター規程（昭和六十二年五月二十九日施行）は、廃止する。

## VI. 英文摘要

### INSTITUTE OF GENETIC RESOURCES

The institute of Genetic Resources had been established in May, 1987, and was then reorganized in April, 1997, within the Faculty of Agriculture, Kyushu University. The Institute is devoted to basic and applied studies on genetics with special interest in the stock maintenance of agriculturally important organisms. Silkworm, rice and fermentative microorganisms are chosen as the main materials from the viewpoint that their scientific researches have been carried out and developed chiefly in Japan. Emphasis has also been placed on studies at molecular level to contribute to the development of biotechnology and to establish gene libraries of these biological resources.

#### **Silkworm Genetics Division**

FUJII, Hiroshi	Ph.D.	Professor
BANNO, Yutaka	Ph.D.	Associate Professor

- a) Linkage analysis of silkworm
- b) Mutagenesis and teratogenesis in silkworm
- c) Analysis of gene expression
- d) Maintenance of the mutant stocks
- e) Construction of a genetic linkage map of silkworm genome
- f) Cytological studies of the deficient and translocated chromosomes

#### **Plant Genetic Division**

SATOH, Hikaru	Ph.D.	Professor
KUMAMARU, Toshihiro	Ph. D.	Associate Professor

- a) Collection, evaluation and preservation of rice genetic resources
- b) Mutagenesis and mutation spectrum in rice
- c) Genetic analysis of induced mutants in rice: Starch, protein and lipid

stored in grain

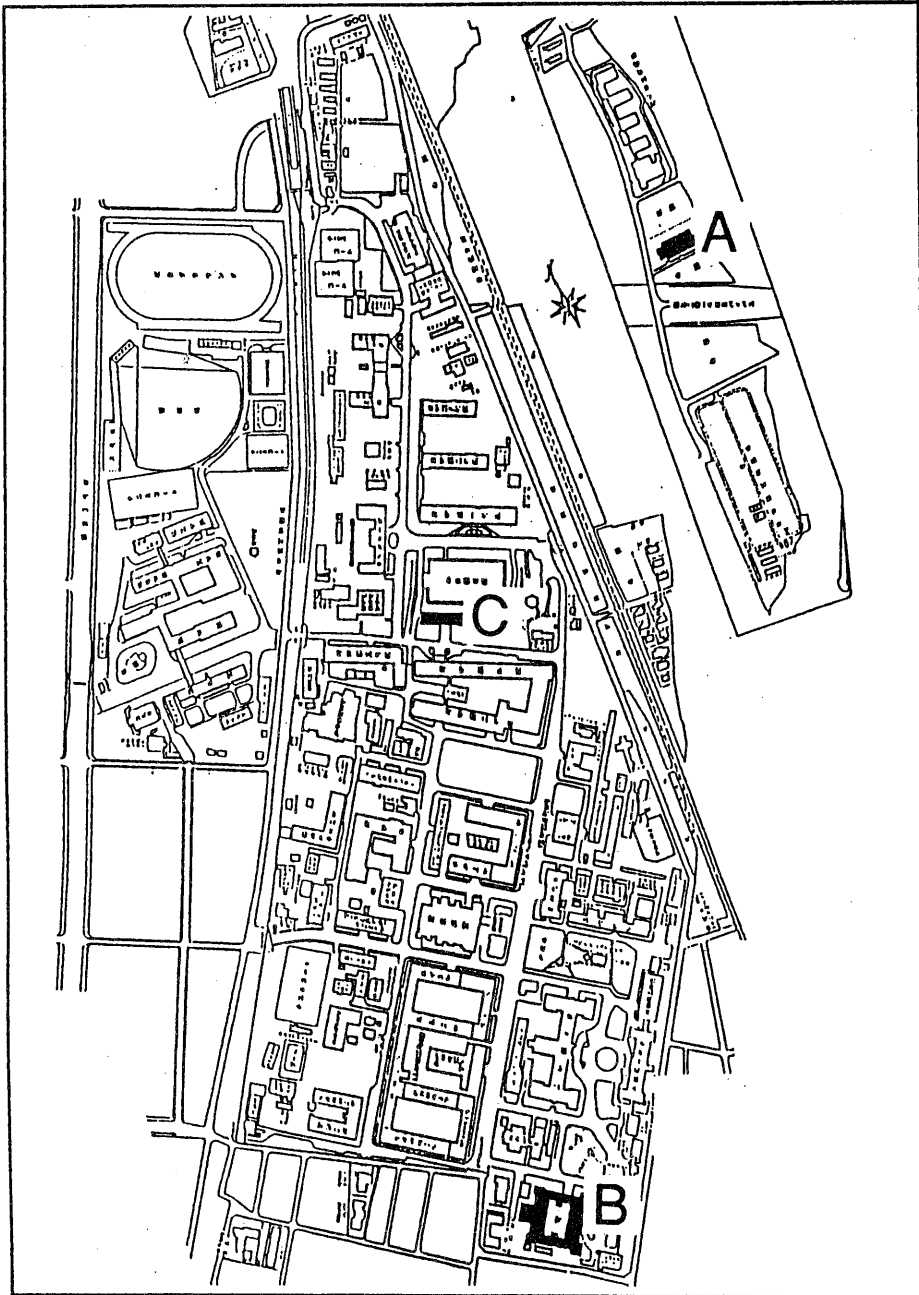
- d) Genome analysis of the useful genes in rice
- e) Isozyme variation in rice, barley and their relatives

**Microbial Genetics Division**

OGATA, Seiya	Ph.D.	Professor
HARA, Toshio	Ph.D.	Associate Professor
DOI, Katsumi	Ph.D.	Associate Professor

- a) Survey, development and preservation of microbial genetic resources
- b) Genetics and breeding of industrial bacteria: *Streptomyces*, *Lactobacillus*, *Bacillus*, etc
- c) Functional analysis and application of novel and useful genes found in industrial bacteria
- d) Differentiation, antibiotic production and pock formation in *Streptomyces*
- e) Genetic engineering in insect cells: Baculovirus expression vector

## VII. センター研究棟配置図



A 家蚕遺伝子開発分野 :

Tel. 092 (641) 1101, Tel. & Fax. 092 (641) 2829

B 植物遺伝子開発分野 :

Tel. & Fax. 092 (642) 3056, 3057, 3058

C 微生物遺伝子開発分野 :

Tel. & Fax. 092 (642) 3053, 3054, 3059



## 編集後記

九州大学農学部附属遺伝子資源開発研究センターの設置に当たり、当センターの活動記録と利用の手引書として、年報第1号を発刊いたしました。この年報が恒久に続くように、また後の編集者が面倒にならないようにできる限り簡素にとオフセット印刷で編集しました。不備不揃いなところもありますが、なにとぞご容赦下さい。

本号の発刊には多くの方々のご協力とご理解をいただきました。ここに深く感謝申し上げます。

今後も、本年報にご意見ご鞭撻を賜りますようお願い申し上げます。

### 編集者

代表	緒方 靖哉
	伴野 豊
	熊丸 敏博
	土居 克実
	西田 壽子

九州大学農学部  
遺伝子資源開発研究センター年報

Annual Report of Institute of Genetic Resources,  
Faculty of Agriculture, Kyushu University

第 1 号

平成10年 4 月発行

九州大学農学部附属遺伝子資源開発研究センター

〒812-8581 福岡市東区箱崎 6 丁目10-1

T E L 092-642-3053

F A X 同 上

E-mail [ogata@agr.kyushu-u.ac.jp](mailto:ogata@agr.kyushu-u.ac.jp)

印刷所 門司印刷株式会社

〒801-0851

北九州市門司区東本町 1 丁目 3 番 9 号

T E L 093-321-4081