

九州大学院 農学研究院
遺伝子資源開発研究センター

年報

第 4 号

平成 12 年

九州大学大学院 農学研究院附属遺伝子資源開発研究センター

目次

I. センター概要	1
1. 目的	1
2. 沿革	1
3. 組織	2
4. 研究および事業内容	2
5. 運営委員会委員	3
6. 組織図	4
II. 研究成果	5
1. 研究業績・出版物リスト	5
2. 原著論文要旨	8
3. 総説等要旨	21
4. 講演要旨	31
III. センターの活動状況	64
1. 教育活動	64
2. 科学研究費・共同、受託研究等	68
3. 講演会・セミナー・講習会	70
4. 海外渡航	70
5. 学会賞受賞等	72
6. 学術会議の開催・運営	72
7. センター運営委員会	72
IV. 遺伝子資源系統の保存・管理	73
V. センター内規	81
VI. 英文摘要	84
VII. センター研究棟配置図	86
編集後記	87

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、これに参画した。
- 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。
- 平成12年4月 大学院重点化に伴い、大学院 農学研究院附属遺伝子資源開発研究センターに改組された。また、大学院教育として生物資源環境科学府 遺伝子資源工学専攻 遺伝子資源開発学講座（昆虫遺伝子資源学分野、植物遺伝子資源学分野、微生物遺伝子工学分野）に改組された。

3. 組織・教職員

センター長 緒方 靖哉

家蚕遺伝子開発分野

教授	藤井 博	技官	田村 圭
助教授	伴野 豊	非常勤研究員	嬉野 健次
技官	西川 和弘	非常勤研究員	中村 隆
技官	西坂 章文	技能補佐員	江口 誠一
		教務補佐員	夏 慶友

植物遺伝子開発分野

教授	佐藤 光	非常勤研究員	竹本 陽子
助教授	熊丸 敏博	非常勤補佐員	魏 暁麗
		非常勤補佐員	原田 良子
		非常勤補佐員	北野 久美子
		非常勤補佐員	馬場 知佐子

微生物遺伝子開発分野

教授	緒方 靖哉	講師	土居 克実
助教授	原 敏夫	非常勤研究員	山口 健一
		研究支援推進員	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

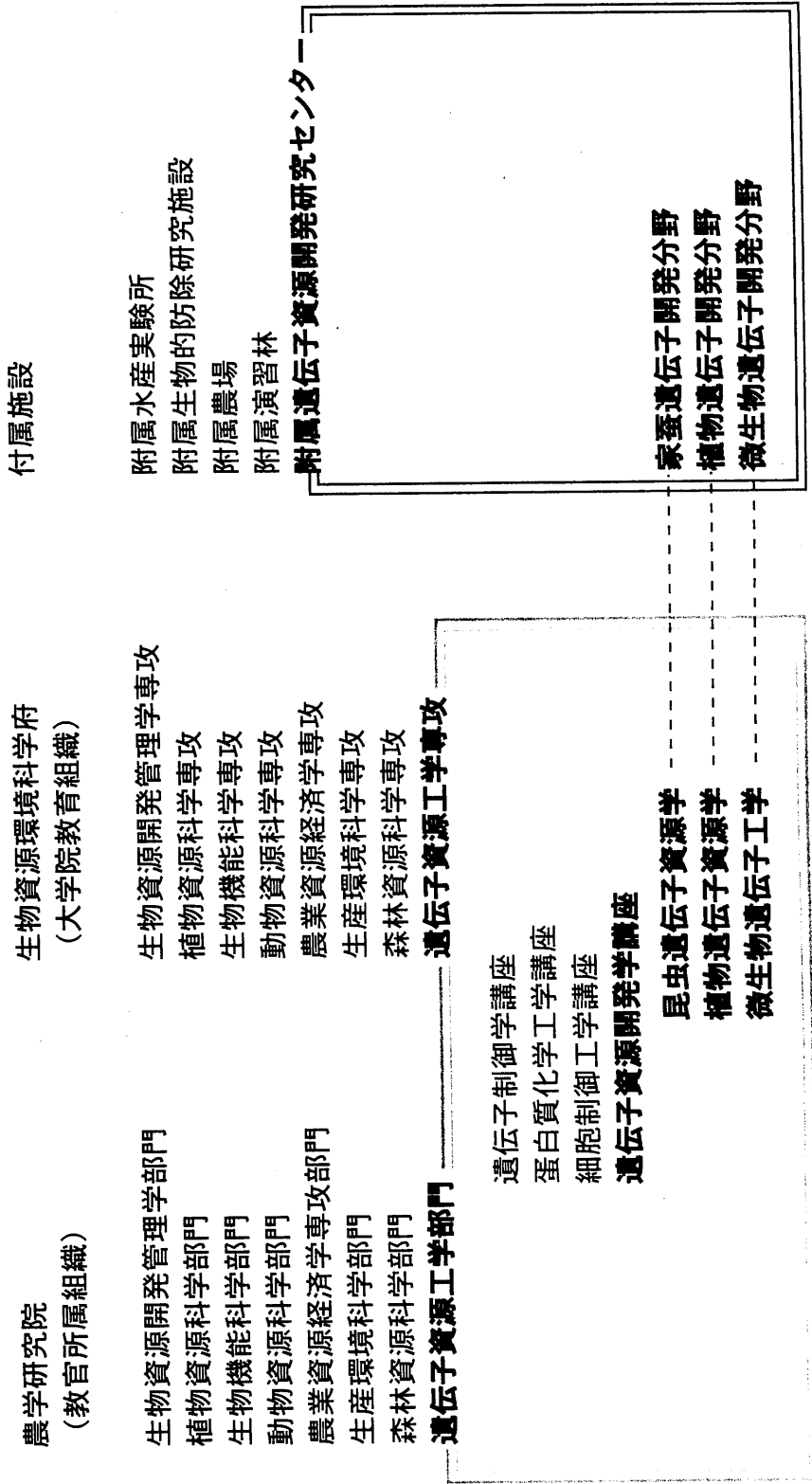
微生物遺伝子開発分野

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 (平成12年5月1日 現在)

委員長	緒方 靖哉	教授	村田 武 (農業資源経済学部門)
教授	藤井 博 (センター)	助教授	小林 哲夫 (生産環境科学部門)
助教授	熊丸 敏博 (センター)	教授	白石 進 (森林資源科学部門)
講師	土居 克実 (センター)	助教授	若菜 章 (附属農場)
教授	吉村 淳 (生物資源開発管理学部門)	教授	小川 滋 (附属演習林)
助教授	齋藤 和幸 (植物資源科学部門)	教授	白畑 實隆 (遺伝子資源工学部門)
教授	木村 誠 (生物機能科学部門)	助教授	田代 康介 (遺伝子資源工学部門)
助教授	服部 眞彰 (動物資源科学部門)		



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

- Jiang Y. H., Banno Y. and Fujii H.: Genetic variant and inheritance of the 35K protease in digestive juice of silkworm, *Bombyx mori* *J. Seric. Sci. Jpn.*, **69** (3), 225-227. (2000)
- Ichida M., Doi S., Miura Y., Nakamura T. and Banno Y.: Aseptic rearing of the mulberry wild silkworm, *Bombyxmandarina* *Int. J. Wild silkmoth & silk*, **5**, 69-70, (2000)
- Arai H., Okido T., Fujii H. and Doira H.: Purification and characterization of major esterase BesB from haemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Seric. Sci. Jpn.*, **69** (2), 121-130. (2000)

B その他

- 田村 圭、西川和弘、石原大輔、西坂章文、伴野 豊、藤井 博：カイコの新しい突然変異体、石原不眠蚕の所属連関群、日蚕九州講演集、**1**、4 (2000)
- 中村 隆、伴野 豊、藤井 博：2n=54と2n=56の染色体構成を持つクワコの雑種個体に生じた染色体異常の遺伝、日蚕九州講演集、**1**、14 (2000)
- 西川和弘、西坂章文、田村 圭、江口誠一、石原大輔、大城戸利久、伴野 豊、藤井 博、原和二郎：カイコの形質連関地図と分子遺伝子地図との統合 第一報、日蚕九州講演集、**1**、15 (2000)

植物遺伝子開発分野

A 原著論文

- K. Kusumi, H. Komori, H. Satoh and K. Iba Characterization of a zebra mutant of rice with increased susceptibility to light stress. *Plant Cell Physiol.*, **41**, 158-164, (2000)
- M. Isshiki, M. Nakajima, H. Satoh and K. Shimamoto. *dull*: rice mutants with tissue-specific effects on the splicing of the *waxy* pre-mRNA. *Plant J.*, **23**, 451-460, (2000)

微生物遺伝子開発分野

A 原著論文

- Nishiyama T, Sakemi H, Sumi H, Tokunaga S, Doi K and S. Ogata: A chromosomal locus encoding a phosphoserine phosphatase- and a truncated MinD-like protein affects differentiation in *Streptomyces azureus* ATCC14921, *FEMS Microbiol. Lett.*, **190**(1), 133-139 (2000)
- Eguchi T, Doi K, Nishiyama K, Ohmomo S, Ogata S.: Characterization of a phage resistance plasmid, pLKS, of silage-making *Lactobacillus plantarum* NGR10101, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **64**(4), 751-756 (2000)
- Tarui, H., Imanishi, S. and T. Hara: A novel cell-free translation/glycosylation system prepared from insect cells, *J. Biosci. Bioeng.*, **90**(5), 508-514 (2000)
- Imanishi, T. Yamaguchi, T. Hattori, H. Nakauchi and A. Koito: Differential level in co-down-modulation of CD4 and CXCR4 primed by HIV-1 gp120 in response to phorbol ester, PMA, among HIV-1 isolates, *Microbiol. Immunol.*, **44**(6), 489-498 (2000)
- Tarui, H., Murata, M., Tani, I., Imanishi, S., Naishikawa, S. and Hara, T.: Insect cell extract preparation by the nitrogen disruption method for cell-free translation, *J. Fac. Agr., Kyushu Univ.*, **45**(1), 135-148 (2000)

- Nishiyama T, Kamachi, Y., Yokoyama, E., Doi K and S. Ogata: Characterization of a cloned chromosomal fragment affecting differentiation in *Streptomyces azureus* ATCC14921, *J. Fac. Agr., Kyushu Univ.*, **45**(1), 225-236 (2000)
- Nitisinprasert, S., Nilphai, V., Bunyun, P., Sukyai, P., Doi, K. and Sonomoto, K.: Screening and identification of effective thermotolerant lactic acid bacteria producing antimicrobial activity against *Escherichia coli* and *Salmonella* sp. Resistant to antibiotics, *Kasetsart J.*, **34**(3), 387-400 (2000)
- Eguchi T, Kaminaka K, Shima J, Kawamoto S, Mori K, Choi SH, Doi K, Ohmomo S and S. Ogata: Isolation and characterization of enterocin SE-K4 produced by thermophilic enterococci, *Enterococcus faecalis* K-4, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **65**(2), 247-253 (2001)

B 著書・総説等

- 原 敏夫：昆虫機能を利用したHIV-1エンベロープ蛋白質gp120生産技術の開発，*蚕糸昆虫研COEニュースレター*，**13**，4 (2000)
- 横山 英之，緒方 靖哉：細菌のHU型ヒストン様タンパク質“ヒストン様”という概念を超えて，*化学と生物*，**38**，804-810 (2000)
- 緒方 靖哉，土居 克実：遺伝子ターゲティングの基礎，「動物細胞工学ハンドブック」，日本動物工学会編，朝倉書店，p212-218 (2000)
- 緒方 靖哉，江口 智子，土居 克実：発酵生産プロセスにおけるバクテリオファージ汚染の防御－宿主の防御機構解明と応用へのアプローチ－，*ウイルス*，**50**，17-26 (2000)
- 土居 克実：*Lactobacillus*属乳酸桿菌の遺伝子操作による産業利用株の作出，三島海雲記念財団研究報告書，第37号，51-54 (2000)
- Ogata, S.: Replication and Transmission of *Streptomyces* conjugative plasmids, Research Report (1985 – 1999), 274-279, The Waksman Foundation of Japan Inc. (2000)

2. 原著論文要旨

家蚕遺伝子開発分野

日蚕雑 69 (3), 225-227 (2000) : Short report
J. Seric. Sci. Jpn.

Genetic variant and inheritance of the 35K protease in digestive juice of silkworm, *Bombyx mori*

YONGHUANG JIANG^{1,2)}, YUTAKA BANNO²⁾ and HIROSHI FUJII²⁾

1) College of Animal Science, Zhejiang University, China

2) Faculty of Agriculture, Kyushu University, Japan

(Received, Feb. 17, 2000)

Key words: genetic analysis, polymorphism, 35K protease, digestive juice, *Bombyx mori*

The digestive juice of the larvae of the silkworm, *Bombyx mori* include many proteases. Some were isolated and characterized (EGUCHI and IWAMOTO, 1982; SASAKI and SUZUKI, 1982; KIDO *et al.*, 1986; KOTANI *et al.*, 1999), but their heterogeneity has not been investigated, for except one case (EGUCHI and YOSHITAKE, 1967).

We purified an enzyme named as 35K protease from silkworm digestive juice (JIANG *et al.*, 2000). This enzyme is a chymotrypsin-like protease and was inhibited by CI-8 (SHIRAI *et al.*, 1997) in the larval hemolymph. During our investigation, we discovered polymorphism of the 35K protease from digestive juice of silkworm. In this paper, we focus on polymorphism and the mode of inheritance of 35K protease.

Materials and Methods

Experimental animal and preparation of digestive juice: The silkworm strains stocked by the Institute of Genetic Resources, Kyushu University were reared on mulberry leaves at 25°C. Digestive juice was collected individually from five to ten larvae per each strain on the 3rd day of the 5th instar, after starvation for approximately

four hours, by applying an electric shock, and stored at -20°C until use.

Polyacrylamide gel electrophoresis: Digestive juice was analyzed for protease by native polyacrylamide gel electrophoresis (native-PAGE, under undenaturing condition). Native-PAGE were prepared with 7.5% polyacrylamide as described previously (JIANG *et al.*, 2000). The volume of sample applied was 6µl per lane. After electrophoresis, the gels were washed using distilled water and dried for 5 minutes at room temperature. The staining solution containing 1mg/ml of N-acetyl-D, L-phenylalanine-β-naphthylester dissolved in N, N'-dimethylformamide and 1mg/ml of tetrazotized orthodiansidine dissolved in 0.04 M sodium phosphate buffer, pH 7.4, was poured onto the gels, which were then incubated at room temperature for 10 minutes. The 35K protease activity was observed as a deep red band on a light red background.

Results and Discussion

Two electrophoretic variations in 35K protease were observed by polyacrylamide gel electrophoresis of digestive juice samples from the larvae of 60 strains. The two types of the 35K protease dealt with in this study were designated as Type A and Type B (Fig. 1), for the former migrated faster toward an anode and the

1) College of Animal Science, Zhejiang University, 268, Kaixuan Road, Hangzhou, 310029, China

2) Faculty of Agriculture, Kyushu University, Hakozaki 6-10-1, Higashi-ku, Fukuoka 812-8581, Japan

Aseptic Rearing of the Mulberry Wild Silkworm, *Bombyx mandarina*

Masatoshi ICHIDA¹⁾, Syuji DOI¹⁾, Yoshiko MIURA¹⁾, Takashi NAKAMURA²⁾ and Yutaka BANNO²⁾

¹⁾ Faculty of Textile Science, Kyoto Institute of Technology, Saga-ippongicho Ukyou-ku Kyoto-city Kyoto.

²⁾ Faculty of Agriculture, Kyushu University, Hakozaki Higashi-ku Fukuoka-city Fukuoka.

Introduction

The mulberry wild silkworm (*Bombyx mandarina*) is an important material for comparative studies with the domestic silkworm as well as for studies on themselves. However, rearing of the mulberry wild silkworm in laboratory is difficult. TANIGUCHI and NINAGI (1983) reported on the masrearing method of the silkworm by fresh mulberry leaves. NINAGI and TAKEDA (1982) reported that it could be raised on the artificial diet throughout the larval instar TAKEDA and NINAGI (1983) also reported the feeding habit of the mulberry wild silkworm. Here, we report a new aseptic rearing method for the mulberry wild silkworm on an artificial diet by plate-feeding.

Materials and Methods

The artificial diet used in the experiment were shown in Table 1. KIT2516 was the diet designed for hybrid strains of domestic silkworm, and KIT4016 and KIT404110 were for the parent strains.

Eggs of the mulberry wild silkworm were collected in Nagano Prefecture. Preparation of artificial diets and rearing were performed according to the method described by MATSUBARA (1975). Twenty larvae of each group were reared in styrene cases at 30 °C. They were fed the artificial diet at hatching and the diet was replaced 13 days after the first feeding.

Results and Discussion

None of newly hatched larvae of the wild silkworm are KIT2516 and KIT4016, but 12 of 20 larvae (60%) took KIT404110 and 11 larvae spun cocoons, then, emerged as adults.

The larvae period ranged from 16 to 27 days, the pupal stage lasted for 14–20 days and thus, 31–46 days elapsed from hatching to emergence.

Characteristics of cocoons produced by the larvae reared on the diet, KIT404110 were shown in Table 2. Cocoon weight, cocoon shell weight and cocoon shell ratio were 0.565g, 4.16cg and 7.62%, respectively. There were marked differences in these characteristics between sexes.

Table 1 Composition of diets (%)

	KIT2516	KIT4016	KIT404110
Mulberry leaf powder	25.0	40.0	40.0
Soy-protein	40.0	35.0	41.0
Tofu-cake powder	16.0	16.0	—
Corn starch	10.0	—	10.0
Citric acid	2.0	2.0	2.0
Sterol	0.4	0.4	0.4
Ascorbic acid	1.5	1.5	1.5
Vitamin mixture	1.5	1.5	1.5
Mineral mixture	3.0	3.0	3.0
Other	0.6	0.6	0.6

Purification and characterization of a major esterase BesB from hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*

HITOSHI ARAI, TOSHIHISA OKIDO, HIROSHI FUJII and HIROSHI DOIRA

Institute of Genetic Resources, Faculty of Agriculture, Kyushu University

(Received May 31, 1999)

Total esterase activity in the hemolymph of *Bombyx mori* was measured using α -naphthyl acetate as a substrate. It was low during the early fifth instar, then sharply increased at the spinning stage and stayed high throughout the pupal stage. One of the major hemolymph esterases of *B. mori*, previously named BesB (blood esterase B type), was purified from day 1 pupae to homogeneity using procedures such as procainamide hydrochloride affinity chromatography. BesB had an apparent molecular weight of 58,000 and an isoelectric point of 4.6. It was most active at pH 6-7, and was stable around pH 7 to 9. The sequence of N-terminal 28 amino acid residues was partially homologous to previously reported esterases isolated from the peach-potato aphid *Myzus persicae*. In kinetic parameters, there were no differences in K_m values from four tested substrates, but there were differences in V_{max} values. BesB had the highest sensitivity to paraoxon and diisopropyl fluorophosphate (DFP), and was moderately affected by eserine sulfate, phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) and chloromercuribenzoic acid (*p*CMB). These results indicate that BesB is a carboxylesterase in hemolymph.

Key words: *Bombyx mori*, Bes, hemolymph purification carboxylesterase.

Introduction

Esterases (carboxylesterases; E. C 3. 1. 1.) are ubiquitous in living organisms. Several esterases have been isolated from various tissues of plants and animals as well as microbes and investigated for their biochemical properties (BROGDON 1988; THOMAS *et al.*, 1993). Also, esterases are widespread among insect species and function in the digestion of nutritional materials (KAPIN and AHMAD, 1978), in detoxification of xenobiotics (DAUTERMAN and HODGSON, 1978), and in reproduction (RICHMOND *et al.*, 1980).

Many esterases, however, do not show strict substrate specificity, and it is difficult to reveal their endogenous substrates except in the case of cholinesterases.

In *Bombyx mori*, esterases have been studied from the standpoint of genetics. Polymorphism of esterase allozymes observed by their differential mobility on agar gel electrophoresis was found in hemolymph, silk glands, fat bodies, midguts, eggs and integuments (YOSHITAKE and EGUCHI, 1965; YOSHITAKE and AKIYAMA, 1965; EGUCHI *et al.*, 1965; EGUCHI and YOSHITAKE, 1967). The hemolymph esterase of *B. mori* comprises the three major allozymes BesA, BesB and BesC (blood esterase), and their expression is controlled by the codominant alleles *Bes^A*, *Bes^B* and *Bes^C*, respectively. The allele for BesO (absence of

Institute of Genetic Resources, Faculty of Agriculture, Kyushu University, 6-10-1, Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka, 812-8581, Japan

Characterization of a *zebra* Mutant of Rice with Increased Susceptibility to Light Stress

Kensuke Kusumi¹, Hisayo Komori¹, Hikaru Satoh² and Koh Iba^{1,3}

¹ Department of Biology, Kyushu University, Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka, 812-8581 Japan

² Institute of Genetic Resources, Faculty of Agriculture, Kyushu-University, Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka, 812-8581 Japan

The rice *zebra* mutant TCM248 is a single recessive mutant. This mutant develops transverse-striped leaves with green and white sectors under alternate light/dark growth conditions. Mutants that were grown under a higher light intensity during the light period showed a more intense striped phenotype. The white tissues contained abnormal chloroplasts with few internal membrane structures, while the green tissues in the mutants contained normal chloroplasts. The white tissue contained only trace amounts of Chls and carotenoids, and mRNA accumulation of nuclear genes encoding chloroplast proteins (*rbcS*, *cab*) was strongly suppressed compared to that in the wild type plants. A series of growth condition shift experiments demonstrated that the mutant displayed the striped phenotype only if it was exposed to the alternate light/dark growth conditions during a limited stage of early leaf development. These data suggest that the *zebra* gene is involved in the acquisition of photoprotective capacity of the plants and that this gene functions at an early stage of chloroplast differentiation.

Key words: Chloroplast development — Leaf development — *Oryza sativa* — *zebra* mutant.

Photosynthetic organisms acclimate to changes in various environmental factors such as light, temperature, and nutrients by optimizing the photosynthetic apparatus. Light is a substrate for photosynthesis, but it is also a potential source of photooxidative damage to cellular and subcellular structures. When the absorbed light energy exceeds the rate of the photochemical reaction, photoinhibition, or inhibition of photosynthetic activity, occurs. Photoinhibition is a reversible process that does not directly cause chlorophyll bleaching or tissue damage. However, after a prolonged period of photoinhibition, the generated reactive oxygen species oxidatively damage plant cells, resulting in bleaching or photodestruction of chloroplast pigments and structural damage to chloroplasts and other organelles. Plants possess various protection systems against excess light stress, including regulation of pigment

biosynthesis, the xanthophyll cycle, stabilization of light-harvesting system, and scavenging reactive oxygen species (Demming-Adams and Adams 1992, Foyer et al. 1994). These systems are very complex, and their efficiency is affected by the age of the plant (Kar et al. 1993, Corona et al. 1996, Falbel et al. 1996, Mock et al. 1998) as well as other environmental factors (Pastenes and Horton 1996, Thompson et al. 1989). However, the precise mechanism that regulates these processes is still unknown.

Many mutants with enhanced sensitivity to light stress have been identified (Niyogi 1999). These mutants develop nearly normal green leaves under low light conditions. However, under middle- or high-intensity light, they suffer necrotic or chlorotic damage. Destruction of chloroplast morphology, reduced PSI and PSII activity, and activation of antioxidant enzymes are generally observed in the damaged leaf cells (Niyogi 1999). These phenotypes in the mutants have been attributed to photooxidation due to destruction of the photoprotective machinery. In fact, some light-dependent necrotic/chlorotic mutants are deficient in a specific component of the photoprotective systems. For example, barley *tigrina* mutants have a defect in the regulation of chlorophyll biosynthesis and accumulate abnormally high amounts of protochlorophyllide in the dark (Nielsen 1974, Casadoro et al. 1983, Hansson et al. 1997). Under high-intensity light, the excess protochlorophyllide is photooxidized, leading to oxidative damage to the plant. The *immutans* mutant of *Arabidopsis* shows a light-dependent "variegated" phenotype. This mutant gene was cloned and found to encode a protein that seems to function in the electron transfer chain in chloroplasts (Carol et al. 1999, Wu et al. 1999). Analysis of these mutants provided a powerful tool for elucidating the mechanisms of the regulation of the photoprotection system in higher plants.

In this report we describe a rice mutant called *zebra* that is characterized by transverse green and chlorotic bands in the leaves. We found that the *zebra* mutation affects chloroplast differentiation only at a limited stage during early leaf development, resulting in light-dependent damage to leaf tissues. Within the chlorotic tissues of the mutant, carotenoid accumulation and the expression of some nuclear genes involved in the chloroplast biogenesis were suppressed. We propose that the *zebra* gene product contributes to the acquisition of the photoprotective ca-

³ Corresponding author: Fax, +81-92-642-2621; e-mail, koibascb@mbx.nc.kyushu-u.ac.jp.

dull: rice mutants with tissue-specific effects on the splicing of the waxy pre-mRNA

Masayuki Isshiki¹, Midori Nakajima², Hikaru Satoh³ and Ko Shimamoto^{1,*}

¹Laboratory of Plant Molecular Genetics, Nara Institute of Science and Technology, 8916-5 Takayama, Ikoma 630-0101, Japan,

²Yokohama Research Center, Mitsubishi Chemical Co., 1000 Kamoshida, Aoba-ku, Yokohama 227, Japan, and

³Faculty of Agriculture, Kyushu University, Hakozaki, Fukuoka 812, Japan

Received 8 February 2000; revised 25 April 2000; accepted 8 May 2000.

*For correspondence (fax +81 743 72 5509; e-mail simamoto@bs.aist-nara.ac.jp).

Summary

In the endosperm of japonica rice, *du-1* and *du-2* mutations cause the reduction of amylose contents. It was previously shown that the *Wx^b* allele of rice, which is predominantly distributed in japonica rice, has a mutation in the 5' splice site of intron 1 resulting in the creation of two weak 5' splice sites within exon 1. In *du-1* and *du-2* mutants, spliced *Wx^b* transcripts were highly reduced, whereas the processing of transcripts derived from three other genes highly expressed in endosperm was not apparently influenced. Results of competitive RT-PCR analysis indicate that transcripts spliced at the two newly created 5' splice sites were equally affected in these two mutants. Genetic and molecular analyses of the effects of *du-1* and *du-2* on *Wx^a* pre-mRNA with normal splice sites indicate that these two mutations do not affect the processing of *Wx^a* pre-mRNA after splicing, suggesting that *du-1* and *du-2* are mutations of genes required for the efficient splicing of mutated *Wx^b* pre-mRNA. Furthermore, *du-1* and *du-2* showed differential effects in endosperm and pollen. Although both mutations caused similar effects on the splicing of *Wx^b* transcripts in endosperm, *du-1* caused higher reduction of *Wx^b* mRNA in pollen than in endosperm, while *du-2* had a lesser effect in pollen than in endosperm. Based on these results, we propose that the *du-1* and *du-2* loci of rice encode tissue-specifically regulated splicing factors that are involved in alternative splicing of pre-mRNA in rice.

Keywords: rice, pre-mRNA splicing, alternative splicing, *waxy* gene, plants, splicing mutants.



A chromosomal locus encoding a phosphoserine phosphatase- and a truncated MinD-like protein affects differentiation in *Streptomyces azureus* ATCC14921

Takashi Nishiyama, Hirohito Sakemi, Harukata Sumi, Satoko Tokunaga, Katsumi Doi,
Seiya Ogata *

Microbial Genetics Division, Institute of Genetic Resources, Faculty of Agriculture, Graduate School, Kyushu University, Hakozaki 6-10-1, Higashi-ku, Fukuoka 812-8581, Japan

Received 2 May 2000; received in revised form 19 June 2000; accepted 28 June 2000

Abstract

We isolated BaA1, a representative transformant of thiostrepton-producing strain *Streptomyces azureus* ATCC14921, which carries an approximately 2.5-kb chromosomal DNA fragment on a high-copy-number plasmid. While strain BaA1 formed little aerial hyphae, its morphological defect was restored by cultivation with *S. azureus*, *S. laurentii*, etc. Strain BaA1 strongly inhibited the growth of *Bacillus subtilis* more than its parent strain, and also inhibited the development of its parent and some *Streptomyces* strains with thiostrepton resistance. Furthermore, it induced *Streptomyces coelicolor* A3(2) to produce undecylprodigiosin, at an early stage of growth. The 2.5-kb fragment contained two *orfs*, *orf1* and truncated *orf2*. The deduced products were somewhat similar to phosphoserine phosphatase-like protein and the N-terminal region of MinD-like protein, respectively. The individual function of *orf1* or the function of both *orf1* and truncated *orf2* seems to induce particular phenotypes or properties in strain BaA1. © 2000 Federation of European Microbiological Societies. Published by Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: Morphological differentiation; Secondary metabolite; Aerial mycelium-negative transformant; *Streptomyces azureus*

1. Introduction

Streptomycetes undergo a complex cycle of morphological and physiological differentiation resembling that of filamentous fungi. A spore germinates to form substrate mycelium, aerial hyphae rise from the colony surface, and aerial hyphae septate into chains of pigmented spores. Morphological and physiological differentiation of *Streptomyces* are temporally coordinated [1], suggesting the existence of shared global regulatory elements for differentiation. Genes that promote morphological and physiological differentiation have been identified and characterized, include *bld*, *whi*, *aba*, *abs* and *afs* [2-5]. By cloning of regulatory sequences on high-copy-number plasmids, novel regulators for secondary metabolism and cellular differentiation have been detected and characterized [6,7]. These reports encourage the use of high-copy-number

plasmid to screen for potential developmental regulatory genes or sequences.

We isolated a 2.5-kb chromosomal DNA fragment from thiostrepton-producing *Streptomyces azureus*, using a high-copy-number plasmid. Transformants carrying this plasmid show repressed aerial hyphae formation, and secrete uncharacterized antimicrobial materials. We characterized the transformant and determined the sequence of the 2.5-kb fragment.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains, plasmids and growth conditions

S. azureus PK100C, a plasmid-cured derivative of thiostrepton producing *S. azureus* ATCC14921, was earlier isolated in our laboratory [8]. *Streptomyces coelicolor* A3(2), its pIJ702 [9] carrying derivative and another thiostrepton-producing strain *Streptomyces laurentii* ATCC31255 were used as indicators in antimicrobial activity

* Corresponding author. Tel./Fax: +81 (92) 642 3053;
E-mail: ogata@agr.kyushu-u.ac.jp

Characterization of a Phage Resistance Plasmid, pLKS, of Silage-Making *Lactobacillus plantarum* NGR10101

Tomoko EGUCHI,¹ Katsumi DOI,¹ Kanako NISHIYAMA,¹ Sadahiro OHMOMO,² and Seiya OGATA^{1†}

¹Microbial Genetics Division, Institute of Genetic Resources, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Hakozaki, Fukuoka 812-8581, Japan

²National Institute of Animal Industry, Ibaraki 305-0901, Japan

Received October 18, 1999 ; Accepted December 17, 1999

Phage contamination has resulted in abnormal fermentation in silage. We isolated a phage-resistant strain, *Lactobacillus plantarum* NGR10101 from silage. The strain carried two plasmids, pLKL (6.8 kb) and pLKS (2.0 kb). By curing and retransformation of the plasmids, we clarified that pLKS has phage resistant activity, characterized as no adsorption inhibition. pLKS has 2,025 bp and three orfs, *orf123*, *orf132*, and *orf918*. The predicted amino acid sequence of the *orf918* product showed high similarity to those of Rep proteins of *Pediococcus halophilus* plasmid pUCL287 and *Lactobacillus acidophilus* plasmid pLA103. The replication origin (*ori*) was upstream from *orf918*. There was no gene similar to typical phage resistant genes encoded by known plasmids. The phage resistance of *L. plantarum* NGR10101 may possibly be due to a plasmid-encoded abortive infection.

Key words: phage resistance; plasmid; silage-making *Lactobacillus*

Silage is a storable feed which makes use of lactic fermentation.¹⁾ Phage contamination can result in abnormal fermentation in silage, and in particular, infection is at a high frequency in silage of southwestern Japan such as Kyushu and Okinawa.^{2,3)} This is attributed to high temperatures (over 30°C) and high moisture contents of plant materials (over 80%). Such being the case, phage control is needed for processing and preservation of high quality silage.

There are reports of phage resistance in lactococci,^{4,5)} but not in lactobacilli. Extensive research has been done on interactions between lactococcal phages and their hosts. *L. lactis* was found to have many plasmids coding for natural defense mechanisms against phages, and over 40 plasmids with phage defense barriers have been identified.⁴⁻⁸⁾ The mechanisms of plasmid-encoded phage resistance are grouped as follows: phage adsorption interference, phage DNA injection inhibition, restric-

tion and modification systems, and abortive phage infection (Abi).⁹⁾ Constructing phage-resistant strains by introducing these natural plasmids into phage-sensitive strains is useful for silage fermentation as it is for dairy fermentation.

We isolated many silage-making lactobacilli with high lactic acid production from silage from Kyushu and Okinawa.⁹⁾ In these strains, *Lactobacillus plantarum* NGR10101 showed phage resistance and had two plasmids. These two plasmids are characterized in this work.

Materials and Methods

Bacterial strains, phages, and media. Silage-making lactobacilli used were isolated from Kyushu and Okinawa islands, southwestern Japan, and were grown at 37°C in MRS or GYP medium (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA).¹⁰⁾ *Escherichia coli* JM109 was grown at 37°C in LB medium.¹¹⁾ Erythromycin (5 µg/ml) for lactobacilli, ampicillin (50 µg/ml), and erythromycin (100 µg/ml) for *E. coli* were added to these media, as required.

Ten phages isolated from silage^{2,3)} were classified into seven groups (I, II, III, IV, V₁, V₂, and V₃)¹²⁾ depending on host ranges, DNA homologies, DNA restriction patterns, and protein profiles: group V₃ was newly classified from group V₂ for this work. They were propagated on the common host *Lactobacillus pentosus* NGR10524.³⁾ The solution of each phage was kept at -20°C with 20% (vol/vol) glycerol until use.

Isolation of phage-sensitive mutants. Plasmid-curing experiments were done as described by Ruiz-Barba *et al.*¹³⁾ *L. plantarum* NGR10101 was incubated with various concentrations of SDS (0.1-1.0 mg/ml) and novobiocin (0.1-0.7 µg/ml) for 72 hr. Cultures that grew at the highest concentration of curing reagents were serially diluted with MRS broth and plat-

† To whom correspondence should be addressed.

A Novel Cell-Free Translation/Glycosylation System Prepared from Insect Cells

HIROSHI TARUI,¹ SHIGEO IMANISHI,² AND TOSHIO HARA^{1*}

Institute of Genetic Resources, Faculty of Agriculture, Kyushu University, 6-10-1 Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka 812-8581¹ and National Institute of Sericultural and Entomological Science, 1-2 Oowashi, Tsubu 305-0851,² Japan

Received 10 March 2000/Accepted 4 August 2000

A cell-free translation/glycosylation system derived from lepidopteran (Sf21) cells, which are widely used to express high yields of foreign active proteins that have post-translational modifications, was constructed. The insect cell extract was prepared using a Mini-Bomb cell disruption chamber by nitrogen pressure treatment, which stably retains translational and post-translational components. The *gp120* mRNA was transcribed from the human immunodeficiency virus type-1 envelope glycoprotein *gp120* gene with T7 RNA polymerase. When the *gp120* mRNA was translated in the insect cell-free system, gp120 having a molecular mass of 100 kDa was detected by Western blot analysis. Synthesized gp120 and gp120 expressed in the intracellular fraction of recombinant-baculovirus-infected Sf21 cells had the same molecular mass, and they both had reduced mobility compared with gp120 secreted by recombinant baculovirus-infected Sf21 cells. In contrast, the 56-kDa gp120 protein, which corresponds to the polypeptide backbone of gp120, was synthesized in wheat germ and rabbit reticulocyte systems. The molecular mass of synthesized gp120 decreased from 100 kDa to 61 kDa after endoglycosidase H treatment, indicating that synthesized gp120 had been glycosylated with N-linked oligosaccharides. Furthermore, glycosylated gp120 was bound to human CD4 molecules expressed on the surface of quail cells. These results revealed that the insect cell-free system can synthesize gp120 that is folded in the proper conformation to provide a CD4-binding domain.

[Key words: cell-free translation, glycosylation, insect cell extract, *Spodoptera frugiperda*, HIV-1 gp120, CD4 binding]

A number of cell-free protein-synthesis systems have been prepared from rabbit reticulocytes (1), wheat germ (2), *Escherichia coli* (3), and several culture cell lines. Cell-free protein-synthesis systems, containing a translation machinery, amino acids, energy sources, and an energy regeneration system, have been shown to be capable of translating exogenous mRNA. These systems have the potential to synthesize any desired proteins, including native proteins, proteins toxic to living cells, and artificially modified proteins. The rabbit reticulocyte lysate, wheat germ extract, and *Escherichia coli* extract systems are widely used to characterize synthesized proteins and to investigate their translational mechanisms; however, they are less efficient for producing foreign proteins than living cells. Many studies on stabilizing the reactions and increase the rates of protein synthesis have recently been carried out, and the productivity of the cell-free protein-synthesis systems has been increasing. The development of cell-free protein-synthesis systems has reached the next stage, *i.e.*, the production of active proteins on a commercial scale. Many proteins, however, require post-translational modification to become functional.

Cell-free assay systems for proteins with post-translational modification have been constructed by combining a eukaryotic cell-free translation system and rough microsomes (4–6). These reconstituted assay systems for assessing protein translation and post-translational processing in higher eukaryotes have allowed characterization of the translocational machinery (7, 8), and are being actively used to define the topology of membrane proteins (9) and to elucidate the regulation of N-linked core glyco-

sylation (10). However, they may lack certain components of the post-translation process (11), and heterology may complicate the results (6, 12–14).

The baculovirus expression system has been used to express various proteins in insect cells under the control of a strong polyhedrin promoter (15, 16). Most of the recombinant proteins produced in this system have been shown to be antigenically, immunogenically, and functionally similar to their authentic counterparts, because the insect cells are able to carry out many types of post-translational modifications, such as addition of N- and O-linked oligosaccharides (16).

In this paper, we describe a cell-free translation/glycosylation system prepared from insect cells that can produce functional glycosylated proteins. In the present study, we produced human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) envelope glycoprotein gp120 that is glycosylated and folded in a mature conformation that allows it to bind to CD4. This system was prepared from a single source and includes almost all translational and post-translational components maintained intact by a single-step extraction. It is completely different from conventional cell-free assay systems, such as the rabbit reticulocyte lysate system supplemented with canine pancreatic microsomes, which are mixtures of heterologous fractions. This insect cell-free system will be a useful tool for synthesizing functional glycoproteins and will serve as a model system for elucidating the mechanisms of post-translational modification.

MATERIALS AND METHODS

Cells and culture conditions *Spodoptera frugiperda* (Sf21) cells (17) were grown at 27°C in the IPL41 me-

* Corresponding author.

Differential Level in Co-Down-Modulation of CD4 and CXCR4 Primed by HIV-1 gp120 in Response to Phorbol Ester, PMA, among HIV-1 Isolates

Satoko Tahara-Hanaoka¹, Yuki Ushijima², Hiroshi Tarui², Masayuki Wada², Toshio Hara², Shigeo Imanishi³, Tomoyuki Yamaguchi¹, Toshio Hattori⁴, Hiromitsu Nakauchi¹, and Atsushi Koito^{*,5}

¹Department of Immunology, Institute of Basic Medical Sciences, University of Tsukuba, Tsukuba, Ibaraki 305-8575, Japan, ²Microbiological Genetics Division, Institute of Genetic Resources, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Fukuoka, Fukuoka 812-8582, Japan, ³Laboratory of Cell Engineering, National Institute of Sericultural and Entomological Science, Tsukuba, Ibaraki 305-0851, Japan, ⁴Division of Allergy and Infectious Diseases, Internal Medicine, Graduate School of Medicine, Tohoku University, Sendai, Miyagi, 980-0812, Japan, and ⁵Division of Clinical Retrovirology and Infectious Diseases, Center for AIDS Research, Kumamoto University, Kumamoto, Kumamoto 860-0811, Japan

Received November 15, 1999; in revised form, March 22, 2000. Accepted March 24, 2000

Abstract: HIV-1 enters cells through interacting with cell surface molecules such as CD4 and chemokine receptors. We generated recombinant soluble gp120s derived from T-cell line-tropic (T-tropic) and macrophage-tropic (M-tropic) HIV-1 strains using a baculovirus expression system and investigated the association of CD4-gp120 complex with the chemokine receptor and/or other surface molecule(s). For monitoring the co-down-modulations of the CD4-gp120 complex, a cytoplasmic domain deletion mutant (tailless CD4), which is not capable of undergoing down-modulation by itself in response to phorbol ester PMA, was used. Our studies revealed both cell-type and HIV-1 strain-specific differences. We found that T-tropic gp120s were capable of priming co-down-modulation with tailless CD4 by interacting with CXCR4, whereas M-tropic SF162 gp120 could not after PMA treatment even in the presence of CCR5. Among the T-tropic HIV-1 envelopes, IIIB gp120 was the most potent. Furthermore, the ability of gp120 to prime the PMA induced co-down-modulation of tailless CD4 appeared to be dependent on the concentration of the principal coreceptor CXCR4. Nevertheless, the observation that IIIB gp120 strongly primed tailless CD4 co-down-modulation on human osteosarcoma HOS cells that express undetectable levels of surface CXCR4 raised the possibility that membrane component(s) other than those recently identified can be involved in down-modulation of the CD4/gp120 complexes.

Key words: HIV-1, Coreceptor, Phorbol ester, Down-modulation

The CD4 molecule has been shown to play a crucial role in thymocyte ontogeny and in the activation of mature helper T lymphocytes (for review; 21, 26). The activation of CD4⁺ T lymphocytes mediated by the T-cell receptor (TCR) causes down-modulation of CD4. For the down-modulation, a structural motif within its cytoplasmic tail is shown to be phosphorylated by the phospholipid-dependent protein kinase (PKC) in a Ca²⁺ dependent manner (1, 4). The internalized CD4 is translocated followed by degradation in lysozymes (27, 28). Phorbol esters such as PMA are known to induce a similar response. However, truncated tailless CD4 was

found to be resistant to this phorbol ester-induced down-modulation (3).

Human CD4 also acts as a primary receptor for HIV-1 infection, but cytoplasmic-dependent internalization of CD4 is not required for HIV-1 entry (3, 24). However, soluble gp120 from viruses with a T-cell line-tropic (T-tropic) phenotype could down-modulate the tailless CD4 in response to PMA on human cell lines (15). CXCR4, a receptor for the SDF-1, which is identified as a major coreceptor for T-tropic HIV-1 infection (12), is found to

*Address correspondence to Dr. Atsushi Koito, Division of Clinical Retrovirology and Infectious Diseases, Center for AIDS Research, Kumamoto University, Kumamoto, Kumamoto 860-0811, Japan. Fax: 81-96-373-6537.

Abbreviations: CCR5, CC-chemokine receptor 5; CXCR4, CXC-chemokine receptor 4; GPCRs, G-protein coupled receptors; HIV-1, human immunodeficiency virus type 1; PBS, phosphate-buffered saline; PE, phycoerythrin; PMA, phorbol 1,2-myristate-1,3-acetate; RT-PCR, reverse transcription-PCR; SDF-1, stromal cell-derived factor 1; 7TM, seven-transmembrane.

Insect Cell Extract Preparation by the Nitrogen Disruption Method for Cell-Free Translation

Hiroshi Tarui¹, Masahiro Murata², Ikuko Tani³, Shigeo Imanishi⁴,
Shigemichi Nishikawa⁵, and Toshio Hara

Laboratory of Microbial Genetics, Division of Applied Genetic Resources,
Department of Genetic Resources Technology, Faculty of Agriculture,
Kyushu University, Fukuoka 812–8581, Japan

(Received May 23, 2000 and accepted August 18, 2000)

An insect cell extract for cell-free translation was prepared using a Mini-Bomb cell disruption chamber, a unique device which disrupts biological materials by altering the pressure on these materials. The highest potential extract for cell-free translation was prepared from the cell suspension at a density of 1.0×10^8 cells/ml, then disrupted at a nitrogen pressure of 10 kg/cm². Furthermore, synthesized proteins were stable in this extract, but were degraded by proteinase in an extract prepared with a Potter-Elvehjem homogenizer. The insect cell extract showed efficient activity for translation of protein 2a and coat protein of the brome mosaic virus, while inefficiently translating protein 1a and protein 3a. On the other hand, mainly protein 3a and coat protein were translated in a wheat germ system, while mainly proteins 2a and 3a were translated in a rabbit reticulocyte system. The insect cell-free system appears to possess an unusual property for enhancing translation of exogenous mRNA, making it different from the rabbit reticulocyte and wheat germ systems.

INTRODUCTION

Several types of cell-free translation systems, e. g., wheat germ (Erickson and Blobel, 1983), rabbit reticulocytes (Jackson and Hunt, 1983), *Escherichia coli* (Chen and Zubay, 1983), yeast (Hussain and Leibowitz, 1986), CHO (Moldave and Fischer, 1983), Ehrlich ascites tumor cells (Henshaw and Panniers, 1983) and many other sources, have been developed. Among these, the traditional systems, i. e., wheat germ extract, rabbit reticulocyte lysate and *E. coli* extract systems, are widely used for synthesizing endogenous and artificial proteins for characterization of the protein or in order to elucidate the translational mechanisms. The productivities of these traditional systems have steadily increased (Madin *et al.*, 2000; Kawarasaki *et al.*, 1995; Nakano *et al.*, 1994; Kim *et al.*, 1996), though it is still difficult to compare *in vivo* with *in vitro* phenomena

¹ Laboratory of Microbial Genetics Technology, Graduate School of Genetic Resources Technology, Kyushu University, Fukuoka 812–8581, Japan

² Laboratory of Microbial Genetics, Division of Applied Genetic Resources, Department of Genetic Resources Technology, Graduate School of Bioresource and Bioenvironmental Sciences, Kyushu University, Fukuoka 812–8581, Japan

³ Laboratory of Microbial Genetics Technology, Graduate School of Bioresource and Bioenvironmental Sciences, Kyushu University, Fukuoka 812–8581, Japan

⁴ National Institute of Sericultural and Entomological Science, Tukuba, Ibaragi 305–0851, Japan

⁵ Wakenyaku Co. Ltd. Ichijiyoji, Sakyo-ku, Kyoto 606–8175, Japan

Characterization of a cloned chromosomal fragment affecting differentiation in *Streptomyces azureus* ATCC14921

Takashi Nishiyama*, Yasuharu Kamachi**, Eiji Yokoyama,
Katsumi Doi and Seiya Ogata***

Laboratory of Microbial Genetics, Division of Applied Genetic Resources,
Department of Genetic Resources Technology, Faculty of Agriculture,
Graduate School, Kyushu University, Higashi-ku, Fukuoka 812–8581, Japan
(Received July 31, 2000 and accepted August 18, 2000)

We characterized a transformant BalA1 of thiostrepton-producing strain *Streptomyces azureus* ATCC14921, which carries an approximately 2.5 kb chromosomal DNA fragment in high-copy-number plasmid. While strain BalA1 formed little aerial hyphae, its morphological defect was restored by cultivation with *S. azureus*, *S. laurentii* and *S. coelicolor*. Strain BalA1 strongly inhibited the growth of *B. subtilis* more so than its parent strain, and also inhibited the development of its parent and some *Streptomyces* strains with thiostrepton resistance. Furthermore, it induced *S. coelicolor* A3(2) to produce undecylprodigiosin at an early stage of growth, and to increase in the amount of actinorhodin production. The 2.5 kb fragment contained two *orfs*, *orf1* and truncated *orf2*. The deduced products were somewhat similar to phosphoserine phosphatase-like protein and N-terminal region of MinD-like protein, respectively. The individual function of *orf1* or jointed function of both *orfs* seems to induce particular phenotypes or properties in strain BalA1.

INTRODUCTION

Streptomycetes undergo a complex cycle of morphological and physiological differentiation resembling that of filamentous fungi. A spore germinates to form substrate mycelium, aerial hyphae rise from the colony surface, and aerial hyphae septate into chains of pigmented spores. Morphological and physiological differentiation of *Streptomyces* are temporally coordinated (Champness and Chater, 1994), suggesting the existence of shared global regulatory elements for differentiation. Genes that promote morphological and physiological differentiation have been identified and characterized, include *bld*, *whi*, *aba*, *abs* and *afs* (Aceti and Champness, 1998; Chater, 1998; Fernandez-Moreno *et al.*, 1992; Umeyama *et al.*, 1999). By cloning of regulatory sequences on high-copy-number plasmids, novel regulators for secondary metabolism and cellular differentiation have been detected and characterized (Scheu *et al.*, 1997; Ueda *et al.*, 1999). These reports encourage the use of high-copy-number plasmid to screen for potential developmental regulatory genes or sequences.

We isolated a 2.5 kb chromosomal DNA fragment from thiostrepton-producing *Streptomyces azureus*, using a high-copy-number plasmid. In this report, we char-

* Laboratory of Microbial Genetics Technology, Department of Genetic Resources Technology, Division of Agriculture, Graduate School, Kyushu University

** Laboratory of Microbial Genetics Technology, Department of Genetic Resources Technology, Division of Bioresource and Bioenvironmental Sciences, Graduate School, Kyushu University

*** Corresponding author (E-mail: ogata@agr.kyushu-u.ac.jp)

Screening and Identification of Effective Thermotolerant Lactic Acid Bacteria Producing Antimicrobial Activity Against *Escherichia coli* and *Salmonella sp.* Resistant to Antibiotics

Sunee Nitisinprasert¹, Veeraphol Nilphai¹, Phunjai Bunyun¹, Prakrit Sukyai¹,
Katsumi Doi² and Kenji Sonomoto³

ABSTRACT

Two hundred fifty six isolates of lactic acid bacteria (LAB) displaying antimicrobial activity were isolated from chicken intestine. Twenty effective isolates of LAB show bacteriocin – like activity (BLA) against the target strains resistant to antibiotics (*Escherichia coli* and *Salmonella sp.*) to varying degrees. Broad spectrum inhibition specific (SIS) were found from 6 h cultivation while the longer cultivation time of 12 and 24 h appeared either the loss of BLA or the inhibition activity against the different target strain. Only 3 effective thermotolerant isolates, i.e., KUB-AC5, KUB-AC16 and KUB-AC20, exerted broad SIS against all target strains except *Salmonella sp.* S001. However, BLA belonging to KUB-AC5 could not inhibit growth of *E. coli* E006 and E010 whereas KUB-AC20 did not inhibit only *E. coli* E006. Based on biochemical, physiological and molecular systematic method, these isolates were classified as *Lactobacillus reuteri*.

Key words : lactic acid bacteria, bacteriocin–like activity, antimicrobial activity, *Lactobacillus reuteri*

INTRODUCTION

Lactic acid bacteria (LAB) has been used as a probiotic product in animal such as chicken, pig (Salminen and Marteau, 1997). It produces variety of antimicrobial substances which have beneficial health effects in the host by improving the integrity of the intestine microflora. LAB produces a variety of low molecular mass compounds including acids, alcohols, carbon dioxide, diacetyl, hydrogen peroxide and other metabolites. Many of these

metabolites are bacteriocin, siderophore, reuterin, and benzoic acid (Helander *et al.*, 1997). These compounds effect to various microorganisms including those pathogens . So far a number of antibiotics have been applied to chicken in order to prevent the infection and the increasing dosage of the antibiotics used caused the development of resistant bacterial strains in domestic animals. Therefore, the objective of this paper was (i) to investigate the antimicrobial activity producing LAB from chicken intestine against the antibiotics

¹ Department of Biotechnology, Faculty of Agro-Industry, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand.

² Microbial Genetics Division, Institute of Genetic Resources, Kyushu University, 6-10-1 Hozokaki, Higashi-ku, Fukuoka, 812-8581, Japan.

³ Laboratory of Microbial Technology, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Hakozaiki, Higashi-ku, Fukuoka 812, Japan.



Isolation and Characterization of Enterocin SE-K4 Produced by Thermophilic Enterococci, *Enterococcus faecalis* K-4

Tomoko EGUCHI,² Kazuyo KAMINAKA,¹ Jun SHIMA,^{1,†} Shinichi KAWAMOTO,¹ Katsumi MORI,¹ Seong-Hyun CHOI,² Katsumi DOI,² Sadahiro OHMOMO,³ and Seiya OGATA²

¹National Food Research Institute, 2-1-2 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8642, Japan

²Institute of Genetic Resources, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Hakozaki, Fukuoka 812-8581, Japan

³National Institute of Animal Industry, 2 Ikenodai, Kusasaki, Ibaraki 305-0901, Japan

Received May 24, 2000; Accepted September 28, 2000

Enterococcus sp. K-4, with a bacteriocin-like activity against *E. faecium*, was isolated from grass silage in Thailand. Morphological, physiological, and phylogenetic studies clearly identified strain K-4 as a strain of *E. faecalis*. Strain K-4 produced a maximal amount of bacteriocin at 43–45°C. We purified, for the first time, the bacteriocin produced at high temperature by *E. faecalis* to homogeneity, using adsorption on cells of the producer strain and reversed-phase liquid chromatography. The bacteriocin, designated enterocin SE-K4, is a peptide of about 5 kDa as measured by SDS-PAGE, and Mass spectrometry analysis found the molecular mass of 5356.2, which is in good agreement. The amino acid sequencing of the N-terminal end of enterocin SE-K4 showed apparent sequence similarity to class IIa bacteriocins. Enterocin SE-K4 was active against *E. faecium*, *E. faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Clostridium beijerinckii*, and *Listeria monocytogenes*. Enterocin SE-K4 is very heat stable.

Key words: bacteriocin; enterocin; thermophilic enterococci; natural food preservatives; starter of silage production

Various bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB) have been identified and characterized.^{1,2)} The lantibiotic nisin and pediocin family bacteriocins (class IIa) are active against a broad spectrum of food spoilage bacteria and food-borne pathogenic bacteria, including *Clostridium* and *Listeria* strains.¹⁾ Because these bacteriocins are generally considered to be safe, their use as natural food preservatives has also been widely investigated and discussed.³⁾

In recent years, bacteriocins produced by enterococci have gained interest because bacteriocin-producer strains can readily be isolated from fer-

mented foods and silage⁴⁾ and because many are active against food-borne pathogens.⁵⁾ Enterococcal bacteriocins show considerable diversity. Based on their amino acid sequence similarity and their antimicrobial spectra, most of these bacteriocins have been included in the pediocin family.⁶⁾ Various research groups have attempted to screen enterococcal bacteriocins, and enterococci were mainly isolated from dairy products in the temperate and frigid zones.^{7,8)} We considered that enterococci isolated from a tropical zone might produce novel bacteriocins with properties suitable for adaptation to a tropical niche. Thus, we did screening in a tropical zone and isolated LAB strains, including enterococci from tropical fermented vegetables and silage. Furthermore, the production of bacteriocins at high temperature is a desirable characteristic for industrial production of bacteriocin and for using as a starter culture of silage production. We isolated one of the thermophilic enterococci (strain K-4) from grass silage in Thailand, which produced a bacteriocin against *E. faecium*.

We describe herein the taxonomic identification of bacteriocin producer strain K-4 and purification, primary structure, and antimicrobial spectrum of the bacteriocin, enterocin SE-K4, produced by strain K-4.

Materials and Methods

Bacterial strains, media, and growth conditions. The bacteriocin, enterocin SE-K4, producer *Enterococcus* sp. K-4 was isolated from grass silage in Thailand. Strain K-4 was propagated in MRS (Difco Laboratory, USA) or TGE medium containing (per liter) 6 g of beef extract (Difco), 10 g of tryptone

[†] To whom correspondence should be addressed. Fax: +81-298-38-7996; E-mail: shimaj@nfri.affrc.go.jp

Abbreviations: SDS, sodium dodecyl sulfate; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis; MES, 2-morpholinoethanesulfonic acid; LAB, lactic acid bacteria; PCR, polymerase chain reaction

3. 総説等要旨

家蚕遺伝子開発分野

Bulletin of Sericult. Sci. of Kyushu

日蚕九州講演集 No. 1 (2000)

カイコの新しい突然変異体、石原不眠蚕の 所属連関群

田村 圭・西川和弘・石原大輔・西坂章文・
伴野 豊・藤井 博

九州大学農学部

九州大学大学院農学研究センター保存の蚕系統d31において、1997年夏（第3期）、1齢のまま致死する個体が多発した、同区において正常に発育した個体を相互交配して1蛾育を行ったところ、9区中4区において1齢のまま致死する個体が再び分離した。1齢のまま致死する個体と正常に発育する個体を蛾区別に調べたところ、その分離数は全個体の約4分の1であった。正常に発育した個体の性比はほぼ1:1であったことから、今回認められた変異体は常染色体上の1劣性遺伝子によって支配されている可能性が示唆された。1齢のまま発育できずに致死する突然変異体はカイコではこれまでも多数見出され、それらは遺伝的不眠蚕と総称されている。今回発生した変異体は外観的特徴から遺伝的不眠蚕と類似している。まず、既存の変異体との関係も明らかにする目的で本変異形質を支配する遺伝子の連関分析を行った。第2~9, 11~18, 20~24, 26, 27及び未知連関群を代表する*E-tr*の各連関群の標識遺伝子とは独立であることが明瞭に示された。一方、第10連関群の標識遺伝子第一白卵遺伝子(*w-1*)をホモにもつ系統の雌に本遺伝子に関しヘテロ型の雄を交配したF₂の分離を調べたところ、白眼個体(*w-1*)と正常眼色を持つ個体とが118頭対56頭に分離した。本分離結果はd31系統に出現した遺伝的不眠蚕と類似の変異体が第10連関群に座乗する1劣性遺伝子に支配されていることを示している。これまでに第10連関群には本形質に類似した遺伝子は報告されておらず、新しい遺伝的不眠蚕遺伝子が発見されたことになる。この新突然変異体を発見者に因み石原不眠蚕と命名し、英名をnon-molting of ishihara、遺伝子記号を*nm-is*とする。

2n = 54と2n = 56の染色体構成を持つクワコの 雑種個体に生じた染色体異常の遺伝

中村 隆・伴野 豊・藤井 博

九州大学農学部

カイコ (*Bombyx mori*) の祖先種とされているクワコ (*Bombyx mandarina*) には、染色体数からみると、日本ならびに韓国に生息する $2n = 54$ の集団と中国の $2n = 56$ の 2 集団が確認されている。両タイプのクワコは実験室で交雑可能であり、その交雑後代 F_1 の第一精母細胞の減数分裂中期においては三価染色体に加え断片染色体の発生が確認されている。そこで、この断片染色体の遺伝様式を明らかにする目的で、交雑 F_1 の相互交配およびクワコへの戻し交配を行い、染色体の追跡を行った。まず、断片染色体を得るために、染色体数の異なる両クワコの交雑を行ったところ、孵化率は 63.7% と低率であった。その精原細胞と第一精母細胞の観察を行ったところ、両親の中間型である $2n = 55$ 、 $n = 27$ の染色体構成である個体と $2n = 55 + 1$ 断片染色体、 $n = 27 + 1$ 断片染色体である個体が、同一蛾区に混在して認められた。合計 7 区中の 44 頭の F_1 中の 8 頭に断片染色体が認められ、それらの個体のすべての精原細胞と第一精母細胞に断片が存在した。また、第二精母細胞においても断片染色体が認められ、断片染色体の次代への遺伝が予想されたので、 F_1 の相互交配および $2n = 56$ のクワコへの戻し交配、カイコとの戻し交雑を行った。まず、 F_1 の相互交配より得られた F_2 では、第一減数分裂中期の染色体数に $n = 27$ と 28 の個体が認められるものの、断片染色体は確認されなかった。 $2n = 56$ のクワコに戻し交雑した場合には、第一精母細胞において断片を持たない $n = 27$ と $n = 28$ の個体と断片を持つ $n = 28$ の個体がそれぞれ 1 頭、3 頭、2 頭分離した。その孵化率は 94.5% と高率で染色体異常による胚子期の致死性はないと判断した。さらに、カイコ ($2n = 56$) に F_1 を戻し交配した場合でも孵化率は高く (98.5%) その幼虫発育は正常であり、第一精母細胞において断片染色体が受け継がれているのは明らかであった。

いずれのステージでみられた断片染色体にも共通している点は、(1) 大きさが明らかに小さい。(2) その染色体を持っているか否かによる形質の差は認められなかった。(3) 半数の断片染色体は他の染色体に対合する。この中の(1)と(2)の性質は他の多くの動植物で認められる過剰な B 染色体に類似しており、本研究の断片染色体は B 染色体の発生源の一つであると考えられる。

カイコの形質連関地図と分子遺伝子との統合 —第1報—

西川和弘・西坂章文・田村 圭・江口誠一・石原大輔・
大城戸利久・伴野 豊・藤井 博・原 和二郎¹

九州大学農学部 ・ 蚕糸・昆虫農業技術研究所¹

カイコの遺伝研究は豊富な突然変異体を用いた形質連関地図を中心に進められてきた。近年ではこれに加え、種々の分子遺伝学的手法を用いた遺伝子地図が構築され、研究に利用されてきている。形質連関地図と分子遺伝学的地図によって得られた情報とを相互に有効利用するため両者の連関群の対応付けが求められている。農林水産省蚕糸・昆虫農業技術研究所ではcDNAクローンによる分子遺伝子地図を作成している。本研究では、形質連関地図とcDNAクローンによる分子遺伝子地図との統合を目的に実験を行った。cDNAクローンによる分子遺伝子地図作成は、蚕糸・昆虫研保有の日02号と九州大学保存のp50（大造）との間で見られるcDNAクローンのRFLPに基づいて行われている。そこで、形質連関地図の各連関群を標識する遺伝子を保有した系統と日02あるいはp50（大造）とのF1を作成した。次いでB1世代に標識形質と正常形質を有する個体が分離する組み合わせで戻し交配を行い、分離した標識形質個体と正常形質個体からDNAを抽出した。このDNAサンプルに対してcDNAクローン地図の各連関群を代表するcDNAプローブを用いてサザンハイブリダイゼーションを行った。現在までに明らかになった両者の地図の応を下表に示す。

形質連関地図の連関群	形質	cDNAクローン地図の連関群	cDNAプローブ
4	<i>L</i>	1 8	m 1 4 2
9	<i>Ia</i>	2 7	m 2 9 1
1 1	<i>K</i>	9	m 1 0 8
1 4	<i>U</i>	1 6	m 5 9
1 5	<i>bl</i>	4	m 4 4
2 1	<i>Lan</i>	1 2	m 2 8
2 2	<i>or</i>	2 1	m 1 7 1
2 4	<i>Sel</i>	3	m 2 1 7

蚕糸昆虫研COE ニュースレター

2000年12月20日

No. 13

農林水産省 蚕糸・昆虫農業技術研究所
〒305-8634 茨城県つくば市大わし1-2
<http://www.nises.affrc.go.jp/~coe>

昆虫機能を利用したHIV-1エンベロープ蛋白質gp120生産技術の開発

原 敏 夫

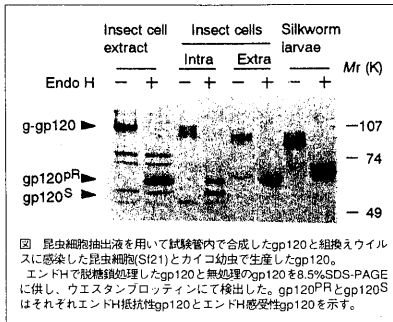


世界的にみてエイズウイルス(HIV-1)感染者数は依然増加傾向にあり、各国で深刻な問題となっている。HIV-1による初期感染は、HIV-1エンベロープ蛋白質であるgp120のV3ドメインと標的細胞であるマクロファージのCD4との

一方、ポリヘドリンプロモーターとその非翻訳領域を利用して鑄型mRNAを作製し、加圧型細胞破碎装置で調製した昆虫細胞抽出液を用いてgp120を試験管内で合成した。翻訳産物の分子量は、Sf21細胞とカイコ同様、100kDaであった。酵素的脱糖鎖反応により翻訳産物へのN型糖鎖の付加を確認した(図)。本翻訳系では、生細胞と同様に分泌シグナル配列が識別され、ミクロソーム内に移行して糖鎖が付加される。一方、脊椎動物由来樹立細胞抽出液を用いた無細胞翻訳系では糖鎖付加能は認められなかった。図中のいづれのgp120もHeLa細胞やQT6細胞表面に発現したCD4と結合し、ドメイン構造等の高次構造形成が示唆された。昆虫機能を利用した蛋白質合成系は、膜蛋白質トポロジーや小胞体ターゲティングへのツールとして応用が期待できるが、蛋白質の普遍的、高効率生産による目的蛋白質の「工場生産」を夢見ている。

結合で始まり、標的細胞のセカンドレセプターであるCCR5を介したHIV-1の取込みで完結する。このような背景から、ワクチン開発のため免疫誘導抗原としてgp120の供給が急がれている。

バキュロウイルス系を用いてマクロファージを標的とするHIV-1(SF162株)のgp120を昆虫細胞(Spodoptera frugiperda IPLB-Sf21-AEII)とカイコで生産した。カイコでの生産量は1g/lに達し、体液由来夾雑蛋白質も硫酸塩析で容易に除去でき、gp120の「昆虫工場」生産も夢ではな



のツールとして応用が期待できるが、蛋白質の普遍的、高効率生産による目的蛋白質の「工場生産」を夢見ている。(九州大学大学院農学研究院)

Development of a Technology to Produce an HIV-1 Envelope Protein gp120 Using Insect Functions

Toshio Hara



The number of patients infected with the AIDS virus (HIV-1) is still increasing around the world, causing serious problems in the countries affected. At the initial stage of HIV-1 infection, the V3 domain of gp120, which is an HIV-1 envelope protein, is bound to CD4 of the macrophages, which on the target cells. Then, HIV-1 is taken in through

insect cells which was prepared using a Mini-Bomb cell disruption chamber. The molecular weight of the translation products was 100 kDa as in the case of the Sf21 cells of *Bombyx mori*. Based on the enzymatic deglycosylation reaction, N-type glycosylation in the coding products was confirmed (Figure).

This cell free translation system enables to differentiate secretion signal sequences as in the case of viable cells, which are transferred into the microsomes where glycosylation occurs. On the other hand, no glycosylation

reaction was confirmed in the case of the cell free translation system using the extract of established cells originating from vertebrata. All of the gp120 shown in the Figure was bound to CD4 that appeared on the surface of HeLa cells and QT6 cells, suggesting the existence of some kind of conformational high-order structure, such as a domain structure. It appears that the protein biosynthesis system using the insect functions can be applied as a tool for membrane protein topologies and endoplasmic

reticulum targeting. The author is currently promoting the development of consistent and efficient "factory production" for target proteins.
(Department of Genetic Resources Technology, Faculty of Agriculture, Kyushu University)

CCR5, which is the second receptor of the target cells. Accordingly, it is anticipated that gp120 could be used as an antigen to induce immunity in the development of vaccines.

Using the baculovirus system, as well as insect cells (*Spodoptera frugiperda* IPLB-Sf21-AEII) and *Bombyx mori*, the author succeeded in producing gp120 of HIV-1 (SF162 strain) which targets the macrophages. The quantity of gp120 obtained using *Bombyx mori* amounted to 1g/l, and the contaminant proteins originating from body liquids could be eliminated easily by salting out with ammonium sulfate. It is no longer impossible to produce gp120 at an "insect factory." Meanwhile, a template mRNA was produced using a polyhedrin promoter and its noncoding region, and then gp120 was biosynthesized in test tubes using an extract of

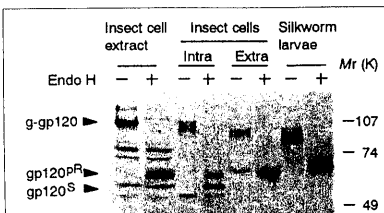
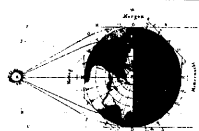


Figure: gp120 synthesized in the insect cell extract, expressed in recombinant baculovirus-infected insect cells or silkworm larvae. Each sample was treated or not treated with Endo H, resolved by 8.5% SDS-PAGE and analyzed by Western blotting. gp120^{PR} and gp120^S refer to the partial endo H-resistant form and sensitive form gp120, respectively.

reaction was confirmed in the case of the cell free translation system using the extract of established cells originating from vertebrata. All of the gp120 shown in the Figure was bound to CD4 that appeared on the surface of HeLa cells and QT6 cells, suggesting the existence of some kind of conformational high-order structure, such as a domain structure. It appears that the protein biosynthesis system using the insect functions can be applied as a tool for membrane protein topologies and endoplasmic

reticulum targeting. The author is currently promoting the development of consistent and efficient "factory production" for target proteins.

(Department of Genetic Resources Technology, Faculty of Agriculture, Kyushu University)



【解説】

細菌のHU型ヒストン様タンパク質

“ヒストン様” という概念を超えて

横山英之, 緒方靖哉*

ヒストン様タンパク質は、ヒストンに相当する“ヒストン様”という概念を超えて、転写制御、DNA-タンパク質複合体の高次構造形成の補助、翻訳への関与の可能性など、様々な細胞内プロセスに関与することが注目されはじめた。最近のヒストン様タンパク質研究の現状を紹介する。

大腸菌で分離されたHUやIHFのような低分子量の塩基性DNA結合タンパク質は、細菌のヒストンとして、“ヒストン様”タンパク質と呼ばれている。これらのタンパク質は、染色体DNAのコンパクト化に直接または間接的に関わっているが、ヒストンのようにヌクレオソーム構造を形成する機能については疑問視されている。現在、ヒストンに相当する“ヒストン様”タンパク質という概念を超えて、GalRリプレッサーとのリプレッソーム(repressosome)の形成による転写制御、さらにトランスポソーム(transpososome)やインバータソーム(invertasome)などのDNA-タンパク質複合体の高次構造形成を補助し、核酸の関わる様々な細胞内プロセスに関与することが注目されはじめた。本稿では、最近のヒストン様タンパク質研究の話題を紹介し、その

機能を検証したい。

細菌の各種ヒストン様タンパク質

染色体DNAは、真核生物、古細菌、真性細菌を問わず、細胞内ではコンパクトにまとめられている。これは、真核生物の場合には、コアヒストンH2A、H2B、H3、H4の8量体とリンカーヒストンH1によってなされている。当初、染色体DNAの構造解析が真核生物よりも遅れていた古細菌や細菌においても、ヒストンに相当するタンパク質の存在が期待されていた。大腸菌において、ヒストンと同様に低分子量の塩基性DNA結合タンパク質であるHUは、そのアミノ酸組成がヒストンH2Bに近似すること、またDNAを凝縮させる作用のあることが明らかになった。続いて、HUと同じように低分子量の塩基性DNA結合タンパク質である大腸菌のHタンパク質のアミノ酸組成がヒストンH2Aと似ており、抗H2A抗体がHと反応すること、また古細菌の*Thermoplasma acidophilum*のHTaのアミノ酸組成と部分アミノ酸配列がヒストンH2AおよびH3と似ていることが報告された。同時期に、大腸菌の染色体がビーズ状の構造をもつとの報告が重なったため、細菌や古細菌に

Bacterial HU-type Histone-like Protein—More than just “histone-like”

* Eiji YOKOYAMA, Seiya OGATA, 九州大学大学院農学研究院

10. 遺伝子操作動物の創出と利用

[1] 遺伝子ターゲッティングの基礎

a. 遺伝的組換え

遺伝子ターゲッティングは、*in vitro*で操作・改変した遺伝子を *in vitro*でゲノム上の特異的な標的部位上で組換えを行わせ、遺伝子の付与・改変から遺伝子置換・破壊を行う手法であるが、その基礎は、従来までに得られた分子遺伝学の知識、取り分け遺伝的組換え (genetic recombination) の知見に依っていると見える。遺伝的組換えは、ウイルスや細菌から動植物に至るすべての生物種において普遍的にみられる現象であり、その基礎的機構はすべての生物種において共通であり、進化の駆動力といっても過言ではない¹⁾。遺伝的組換えは表 10.1 のように大別できるが、遺伝子ターゲッティングは、本書の他項で詳説されているように、それぞれの組換え機構

の特性を利用して行われている。

b. 相同的組換え

相同的組換え (homologous recombination) は 2 つの二本鎖 DNA の間で起こる組換え反応であり、相同な配列があれば、どのような組み合わせでも組換えが起こる。相同組換えの正確性は高く、組換えを行った染色体中では欠失も付加も生じないのが通常である。後述する部位特異的組換えのような配列特異性はないが、相同領域が 75 bp 以下であると組換え頻度が極端に低下するといわれている。また、ある特定の配列間の組換え頻度が高い場合や、染色体の構造によって組換え頻度が低下する場合 (例: ヘテロクロマチン近傍) も知られている。

相同的組換えにはいくつかのモデルが提唱されており、Holliday モデル、Meselson-Radding (Aviemoire) モデル、double-strand break モデルなどがある²⁾。これらはいずれも、二本鎖 DNA の一方あるいは両方の鎖にニックが入り、たがいの鎖の間で鎖の交換が起こり、両方の親由来のヘテロ二本鎖 DNA が生じることを説明している。長い領域のヘテロ二本鎖 DNA が一方の鎖の塩基配列のみに変わり、一方の遺伝子が他方の遺伝子に変わることによって遺伝子変換が起こる。ヘテロ二本鎖中で誤った塩基

表 10.1 遺伝子組換えの例と特徴

組換えの名称	DNAの相同性	配列の特異性	組換えの正確性	例	備考
相同的組換え	長い相同性 (100 bp 以上)	通常なし	高い	・減数分裂時の組換え (シナプトネマ複合体形成) ・大腸菌 RecA タンパク質依存の組換え	一般的な遺伝子ターゲッティングに利用
部位特異的組換え	短い相同性 (50 bp 以下)	あり	高い	・免疫グロブリン遺伝子内の V-J 間の組換え ・ファージ・プラスミドの宿主染色体への組込み	低コピー数の遺伝子クローニング (強毒性遺伝子など) などに利用
トランスポゾンまたは IS 因子の転移	なし	あり	低い	・レトロウイルスの染色体への組込み ・ショウジョウバエの P 因子やコピヤ因子の転移 ・トウモロコシの調節因子の転移	トランスポゾンタギングや遺伝子治療 (レトロウイルスベクターを用いた <i>ex vivo</i> アプローチ) など
非相同的組換え	なし	なし	低い	・トランスフェクションされた DNA の動物細胞染色体への組込み ・ポリオーマ, SV40 などのウイルス DNA の細胞染色体中への組込み ・欠失, 重複, 挿入などの変異	機構が不明または未解明な遺伝子組換え 遺伝子ターゲッティングの妨害要因

総 説

3. 発酵生産プロセスにおけるバクテリオファージ汚染の防御 —宿主の防御機構の解明と応用へのアプローチ—

緒方 靖哉, 江口 智子, 土居 克実

(九州大学大学院・農学研究院・微生物遺伝子工学分野)

はじめに

生物はその最大の捕食者ウイルスの執拗な攻撃を撃退する防御機構を獲得し発展させて生き残ろうとし、ウイルスはそれらの防御を乗り越えて感染を成功させるための機構を発達させている。細菌とそのウイルス(バクテリオファージ, 以下ファージと略)間のサバイバル戦(bacterial defenses and phage counterdefenses)に細菌の有する種々のファージ耐性機構を見出すことができる。ファージ研究の初期の頃から、ファージ耐性変異株が比較的容易に出現することが知られており、それらの解析から細胞表層の変化による耐性が明らかになった¹⁹⁾。1952年頃、大腸菌(*E. coli*)にファージ感染に対して制限と修飾(restriction and modification)現象が見出された^{3,13)}。この機能は、細胞内に侵入したファージなどの異種DNAの増殖を阻止する機能であり、この研究の流れは制限酵素の発見と組換えDNA技術の開発に発展している。一方、ファージは如何にして細菌の有するファージ耐性機構に打ち勝つかの究明も重要であり、多くの知見や課題を提供してきた。

自然界では、ファージの発生は菌種交代などの個体群の変動に関わっていると想像される。実際、ファージ発生による菌種交代現象を、多種多様の菌種・菌株

が活動している活性汚泥浄化槽^{18,20)}(図1)や乳酸菌によるサイレージ発酵¹¹⁾の中に知ることができ、また人為的に特定の菌株を土壤に撒布し続けた場合、これに感染するファージの出現とこれに伴う感受性菌株の盛衰に菌群の変動を知ることができる^{18,21)}。

アミノ酸発酵や抗生物質生産等の発酵工場でも多数の菌体を培養しているため、ファージ汚染を受け易く、発酵生産に多大の損害を被ってきた。発酵タンクに侵入したファージの多くは、工場使用菌株と同種の工場周辺に生息する菌群で増幅したファージであることが明らかになっている^{3,18)}。今日、多くの発酵工場では予防対策を中心とする様々なファージ汚染対策が採られ、深刻な被害は回避できるようになった^{3,18)}。しかし、原料の殺菌を充分に行えないチーズ・乳酸飲料発酵や清酒・漬物等の解放系における発酵ではファージ汚染を免れるのは難しく、有効な汚染対策の開発を目指してファージ耐性機構の解明やその応用に関する研究が今日でも活発になされている^{5,8,19)}。本稿では、発酵産業における一般的なファージ汚染対策にも触れるが、特に、乳酸菌を中心に細菌自身が有する生体防御機能或いはファージ耐性機能を利用したファージ防除対策の研究と応用開発の現状を言及したい。ファージの一般的性質や形態については別に譲る¹⁾。

1. 発酵産業におけるファージ汚染

ファージの汚染は、アミノ酸発酵(*Corynebacterium*)、アセトン・ブタノール発酵(*Clostridium*)、抗生物質発酵(*Streptomyces*, *Bacillus*)、酵素類生産(*Bacillus*)、多糖類生産(*Leuconostoc*)、チーズ・乳酸飲料発酵(*Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*)、漬物類(*Lactobacillus*)、ドライソーセージ発酵(*Staphylococcus*)、醤油(*Pediococcus*)、酒類(*Lectococcus*)等の細菌を利用した多くの発酵の生産でしば

Protection against bacteriophage contamination in industrial fermentation processes

—Investigation and applications of phage resistance mechanisms in bacteria—

Seiya Ogata, Tomoko Eguchi, and Katsumi Doi

Microbial Genetic Division, Institute of Genetic Resources, Faculty of Agriculture, Kyushu University Graduate School, 6-10-1 Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka 812-8581

〒812-8581 福岡市東区箱崎 6-10-1

Lactobacillus 属乳酸桿菌の遺伝子操作による産業利用株の作出

九州大学農学部附属遺伝子資源開発研究センター 講師 土 居 克 実

結 言

乳酸菌は、低 G+C 含量のグラム陽性細菌で、*Lactobacillus*、*Lactococcus*、*Enterococcus* などの多様な菌種から構成されている菌群であり、チーズ、ヨーグルトなどの生乳製品から、発酵ソーセージ、馴れ寿司、漬け物などの発酵食品、清酒、ワインなどの酒類、醤油、味噌などの発酵調味料からサイレージに多岐にわたる様々な製品に利用されている¹⁾。さらに食品製造だけでなく、食品の保蔵に乳酸菌の産生する抗菌物質であるバクテリオシンの利用開発が進む一方、食品分野以外でも、乳酸のポリマーを利用した生分解性プラスチック生産にも精力が注がれている。乳酸菌は世界中のあらゆる地域と場所で分離・利用されており、その分離源としては、発酵製品から植物体、腸内、糞便と極めて広範であり、有史以来、今日までに人類に多大な恩恵を与え続けている安全性の高い菌群でもある。近年、腸管に定着した乳酸菌によるプロバイオティクス効果が取り上げられ、乳酸菌製剤として販売されている以外に、発酵乳成分による血圧降下作用や細胞外多糖や細胞壁による抗腫瘍性、抗変異原性や免疫賦活化などの効用の応用が注目を浴びている。一方、ここ 15 年の間に極めて精巧な遺伝子工学ツールが開発されたことにより、乳酸菌でも、そのゲノムおよびバクテリオファージ（ファージ）、プラスミド、トランスポゾンなどの分子生物学的な基礎知識と応用開発技術が極めて早いスピードで進歩を遂げつつある。

近年の農産物自由化により、安価な輸入肉が日本の畜産業界に深刻なダメージを与えており、国産牛肉や牛乳の安価な生産・供給のために、高価な濃厚飼料に替わる比較的安価なサイレージの活用が求められている。サイレージは飼料植物を *Lactobacillus plantarum* を代表とする乳酸桿菌によって乳酸発酵させて製造する、保蔵性の高い飼料である。現在では、サイロのような大がかりな設備を必要としないロールペールなど種菌となる乳酸菌製剤の販売により、比較的安価で簡便にサイレージの調製が行われつつある。しかしながら、九州・沖縄を中心とする西南暖地では高温多湿気候によって、良質のサイレージの調製が不可能である。その原因として、高温多湿環境下では乳酸発酵が十分に行われないことやファージによる汚染によって乳酸菌が死滅、または極めて悪い成育状況となるためであると考えられている²⁾。

本研究では、西南暖地より分離したサイレージ乳酸桿菌を用い、遺伝子操作による産業利用株の作出を試みた。特に、サイレージ発酵に深刻な被害をもたらすファージ汚染の防除法に関する研究を中心に行った。

実験方法

使用菌株・ファージ・プラスミド

本研究では阿蘇、沖縄、福岡などの西南暖地のサイレージより分離した約 80 菌株の乳酸桿菌を使用し¹⁾、基準株として *Lactobacillus casei*

Replication and Transmission of *Streptomyces* Conjugative Plasmids

Seiya OGATA

Microbial Genetics Division, Institute of Genetic Resources, Faculty of Agriculture,
Graduate School, Kyushu University

In *Streptomyces*, all conjugative DNA transfer seems to depend on activity of the plasmid. However, this plasmid-mediated conjugation is a process clearly different from that functioning in other bacteria, especially gram-negative bacteria in which the mechanisms of DNA processing and replication during plasmid transfer are being extensively investigated.

This report concerns replication of conjugative plasmids of thiostrepton-producing *Streptomyces*, *S. azureus* ATCC14921 and *S. laurentii* ATCC31255, and events during plasmid transfer. The objective of this work is clarification of DNA processing and replication during plasmid transfer between *Streptomyces* mycelia.

Materials and Methods

Plasmid DNA was prepared by the alkaline-method. Southern hybridization was performed using DIG DNA Labeling and Detection kits. DNA sequence determinations with automated sequencer were done using Taq Dye Deoxy Terminator cycle Sequencing kits. Amino acid sequence of the electroblotted protein was determined using a gas-phase sequencer. DNA and protein sequences were analyzed using the DNASIS program and the BLAST searching program. DNA-protein complexes were detected by Southern hybridization.

Localization of newly formed septum and DNA was determined with a phase contrast or fluorescence microscopy. *In situ* PCR was also performed to visualize the localization and movement of DNA.

Results

Replication and factors of plasmid pSA1.1 of *S. azureus*

(1) Replication factors, *ori* and *rep*

Plasmid pSA1.1 accumulated single-stranded DNA as replication intermediates in *S. lividans* TK24, therefore, this plasmid was considered to replicate by a rolling-circle mechanism. The essential replication factors, *ori* and *rep*, were determined and their sites are

mapped together with other genes in Fig. 1. The replication origin, *ori*, of pSA1.1 was classified into the pC194 group. The *rep* gene encoding the replication initiator protein Rep belonging to superfamily I consisted of mostly phage-derived replication proteins (Fig. 2).

(2) DNA-binding protein (histone-like protein) and its gene

A DNA-binding protein ($pI > 9.7$ and about 110 kDa) as the replication factor of pSA1.1 was purified on a single-stranded DNA-Celulose column. The N-terminal amino acid sequence of this protein had a high homology with that of small basic DNA-binding proteins known as histone-like proteins. Thus, this protein was designated as HS1 (Histone-like protein of *S. lividans*). Gel retardation assay revealed that HS1 bound with the single-stranded DNA as replication intermediates of pSA1.1.

The *hup* gene encoding HS1 was cloned and sequenced. The deduced N-terminal amino acid sequence and molecular mass (9851 Da) and PI (9.95) were in good agreement with characteristics of HS1, and the signature sequence for histone-like proteins was evident. Phylogenetic analysis suggested that HS1 did not belong to the cluster of histone-like proteins from most species of bacteria and related relatively to the histone-like protein, TF1, from *Bacillus* phages SPO1, as shown in Fig. 3. 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*.

Furthermore, we cloned the *hup2* gene encoding another histone-like protein HS12, a hybrid protein of prokaryotic HU-type histone-like protein and eukaryotic histone H1.

Structural and functional analysis of sporulation-inhibitory and transfer gene *spi* of plasmid pSA1.1 and *spi* - and *spo III E*-like gene of *Streptomyces* chromosome

In 1993, we had reported detection and the nucleo-

4. 講演要旨

家蚕遺伝子開発分野

日本蚕糸学会大会（東京大学）4月，2000

カイコ成虫翅脈の系統変異

○伴野 豊・中村 隆・日下部宜宏・河口 豊・古賀克己・藤井 博（九大農）

クワコの成虫後翅に存在するRs翅脈とM1翅脈の融合により生じる有柄は、クワコには認められるもののカイコでは認められない場合が多く存在してもその長さは短い形質とされ、カイコとクワコの分類基準として重要視されている（井上、1982）。我々はカイコとクワコの類縁性を検討する一環としてこの形質に着目して研究を行っている。今回、九州大学農学部遺伝子資源開発研究センター家蚕遺伝子開発分野で保存中の系統から無作為に抽出した28系統の有柄部位について調査を行った。その結果、2系統では井上（1982）が指摘したように同部位が極めて短かった（無柄型）ものの、18系統ではクワコと同様な長さを持ち（クワコ型）、7系統では同一系統内で無柄型とクワコ型とを併せ持っていた。また、1系統では有柄部位の位置が逆となっていた。Rs翅脈とM1翅脈の融合により生じる有柄はカイコとクワコとを明瞭に識別する基準とはならず、系統間変異の大きな形質であることがわかった。

日本蚕糸学会大会（東京大学）4月，2000

カイコ絹糸腺のカロチノイド結合タンパクの精製

○天竺桂弘子（感染研・RI）・岡田恵子（日大・生資）

藤井 博（九大・農）前川秀彰・橋戸和夫・高田直子・土田耕三（感染研・RI）

カイコの体液や繭層の黄色素は、桑葉に由来するカロチノイドである。中腸や絹糸腺のカロチノイド透過性を支配する遺伝子も明らかにされ、変異も知られている。しかしながら、これら遺伝子のクローニング等を行われておらず、究明しなければならない問題がのこっている。難水溶性であるカロチノイドの移行に関して、結合タンパクの存在が知られており、カロチノイドの透過性に関して研究を進める上で、結合タンパクを精製することは重要と考えられたので、絹糸腺からカロチノイド結合タンパクの精製をおこなった。

絹糸腺をホモゲナイズした後、イオン交換カラム等によって、黄色に染まったタンパク質が2種類精製され、SDS-PAGEによる分子量は35,000（Y35）と70,000であった。2つのタンパクの抗体を作成してウエスタンブロッティングをおこない、中腸と絹糸腺におけるこのタンパクの存在を調べた。Y35は中腸と絹糸腺に存在したが、Y70は絹糸腺に存在した。白血白繭、黄血白繭や黄血黄繭種における二つのタンパク質の有無をこの方法によって、確認できれば、カロチノイド透過性に関わる変異との関連が明らかにできるものと期待される。

カイコにおけるAnnexin IXのアイソフォームの同定とその発現特性

○夏 慶友・藤井 博・伴野 豊・日下部 宜宏（九大農）

AnnexinファミリーはCa²⁺に依存してリン脂質に結合する蛋白質である。前報で我々は、カイコ未受精卵からAnnexin遺伝子をクローニングし、AnnexinIXと同定した（夏ら，第69回大会）。今回，この遺伝子を用い，カイコ卵cDNAライブラリーをスクリーニングした結果，もう一種のAnnexinIXのアイソフォームを得た。一方，カイコESTデータベースでホモロジー検索を行ったところ，三種類目のアイソフォームの存在することが判明した。そこでこれら遺伝子をクローニングし，全配列を決定した。すなわち，カイコにおいて三つのAnnexinIXcDNAアイソフォームの存在することを明らかにした（AnnexinIX-A，AnnexinIX-B，AnnexinIX-C）。次に，ゲノムDNA配列の解析から，三種類のAnnexinIXは，mRNAの選択的スプライシングによって同じ遺伝子から生じていることを明らかにした。さらに，AnnexinIX-A，AnnexinIX-BとAnnexinIX-Cの蛋白質一次構造上のC末端領域が各々異なっていることから，それぞれ特異的な機能を持っていると考えられる。つづいで，定量的RT-PCR法を用いて，カイコ皮膚，中腸，気管，マルピーギ管，絹糸腺，頭，脂肪体，生殖巣などの組織におけるAnnexinIXの発現量について調べた結果，AnnexinIX-Cは全ての組織に強く発現しているが，AnnexinIX-AとAnnexinIX-Bの発現量は組織によって異なっていた。この結果，A，B，C三種類のAnnexinIXは組織によって，それぞれ特異的な役割をしている可能性が示唆された。

カイコ35KプロテアーゼcDNAのクローニングおよび組織特異的発現

姜 永煌 日下部宜宏 藤井 博 伴野 豊（九大農）

カイコ消化液から精製した35KプロテアーゼのN-末端アミノ酸配列をもとにデザインしたプライマーを用い，中腸cDNAライブラリーから35KプロテアーゼcDNAクローンを単離し，その塩基配列を決定した。このプロテアーゼはシグナルペプチドを含む313個のアミノ酸残基より構成されていた。次に各組織および発育時期における遺伝子発現を解析した結果，このプロテアーゼはカイコの中腸で非常に強い発現が認められ，脂肪体においても弱い発現が認められた。しかしながら，絹糸腺，精巣，卵巣および血球細胞では発現がみられなかった。さらに，中腸を前部，中部と後部に分け，それぞれの発現を解析したところ，中部での発現が強く，後部においても弱い発現があったが，前部では発現していなかった。2齢盛食期から熟蚕期における中腸では，すべての時期において発現が認められ，各齢の盛食期における発現が同齢眠期（5齢は熟蚕）に比較してやや強かった。その後，吐糸開始後には発現が弱くなり，終了期には認められなくなった。以上の結果から，本プロテアーゼ遺伝子の発現は消化吸収の機能に寄与していると考えられる。

植物遺伝子開発分野

日本育種学会 97回講演会 (筑波) 4月、2000年

250 山下和宏・○佐藤 光・西 愛子・浅川今日子 (九大農) 染色体6に座乗するイネの新たな粉質胚乳変異体遺伝子 *floury 3* について

YAMASHITA, K., H. SATOH, A. NISHI, K. ASAKAWA (Fac. Agr., Kyushu U.) A novel floury endosperm mutant gene, *floury 3 (l)*, located on chromosome 6 in rice

イネの胚乳粉質変異については、これまで染色体5に座乗する *floury 1* と染色体4に座乗する *floury 2* の2遺伝子が報告されている。水稲品種「金南風」及び「台中65号」のMNU受精卵処理によって作製した変異体中に、新たな粉質遺伝子変異体 *floury 3 (l)* を見出した。本報告では、その外観形質の特性、遺伝様式ならびに染色体上の位置について報告する。

【材料及び方法】材料には水稲品種「金南風」並びに「台中65号」のMNU受精卵処理によって作製した粉質変異体6系統を用いた。これらの変異体について相互交配を行うとともに、原品種及び既知の粉質性を示す、*floury 1*、*floury 2*、*ac*、*shr 1*、*shr 2*、*sug 1*及び *sug 2* の7遺伝子の検定系統との交配を行い、遺伝様式並びに同座性検定を行った。さらに、三染色体系統 (Triplo 4、6、8~12) 及び標識遺伝子系統との交配を行い、座乗染色体並びに遺伝子座の推定を行った。

【結果及び考察】Table 1 に新たに見出した粉質変異体系統EM 557の玄米の外観形質を示した。この変異体では、粒長及び粒幅は野生型とほとんど変わらないが、粒厚は薄く、系統あるいは登熟条件によっては澱粉の集積が著しく低下し、粒の中央がやや凹み *shrunken* 様となる。

新たな粉質突然変異体6系統間の正逆交配F₁種子はいずれも粉質型を示し、かつ、F₂では粉質以外の分離は認められなかったことから、これらは同一遺伝

子座の突然変異体であることが確認された。粉質変異体6系統と野生型との正逆交配F₁種子の外観は、いずれも野生型の表現型を示した。F₂では、EM 4を除く5系統ではいずれも3:1の期待比に適合する分離を示した。これらの結果から、新たに見出した粉質変異体は劣性単遺伝子支配であると考えられる。

粉質性を示す検定系統とのF₁種子の表現型はいずれも野生型を示し、かつ、F₂では野生型及び両親型の表現形を示す個体の分離が認められたことから、これらは既知の7遺伝子とは異なる遺伝子座の突然変異であることが明らかとなった。以上の結果に基づき、新たに見出した粉質突然変異体遺伝子を *floury 3(l)* (*floury 3(l)*) と命名した。

floury 3(l) 変異体系統 EM 591とTriplo 4、6、8~12とのF₂種子における分離を調査した結果、Triplo 6以外とのF₂では何れも3:1の期待比に適合する分離を示した。Triplo 6とのF₂では、粉質個体の出現頻度は有意に少なかった。F₃分析の結果、三染色体分離の期待比に適合する分離を示し、*floury 3(l)* 遺伝子は染色体6に座乗することが示された。染色体6に座乗する標識遺伝子系統との連鎖関係を調査したところ、*floury 3(l)* 遺伝子はC及び *st 1* 遺伝子と密接に連鎖することが明らかとなった。連鎖分析に基づき、これらの遺伝子は *wx - v 3 - C - floury 3(l) - st 1 - drp 6 - chl 3* で染色体6上に配列すると推察される (Fig. 1)。

Table 1 Grain morphology of *floury 3 (l)* mutant in rice

Genotype	Weight (mg)	Length (mm)	Width (mm)	Thickness (mm)
Normal	24.7 ± 1.80 (100)	5.2 ± 0.16 (100)	3.0 ± 0.08 (100)	2.0 ± 0.10 (100)
<i>floury 3</i>	18.6 ± 1.10 (75)	5.2 ± 0.19 (101)	3.0 ± 0.08 (99)	1.7 ± 0.08 (85)

(): %

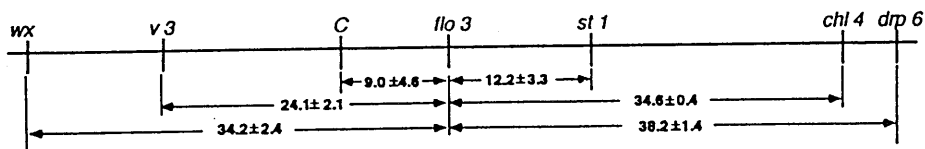


Fig. 1 Tentative location of *floury 3* on chromosome 6 in rice.

251 〇田 懐東¹、佐藤 光¹、熊丸敏博¹、竹本陽子¹、小川雅広² (1.九大院生物資源環境科学、2.山口県大生活科学) イネ57H変異遺伝子 *glup 6 (t)* の遺伝分析

Tian, H.D.¹, H. Satoh¹, T. Kumamaru¹, Y. Takemoto¹, M. Ogawa² (1. Div. Biores. Bioenviron. Sci., Grad. Sch. Kyushu U., Fac. Human Life Sci., Yamaguchi Pref. U.) Genetic analysis of 57H mutant gene, *glup 6(t)*, in rice.

イネグルテリンは、rER上で57kDの前駆体として合成された後、ゴルジ体を経由し液胞へ輸送され、液胞内で α 及び β サブユニットに開裂し蓄積する。57H変異体はグルテリンの輸送・蓄積に関与する遺伝子の変異によると考えられ、グルテリン前駆体を多量に蓄積する。これまでに遺伝子座の異なる6つのイネ57H変異遺伝子を報告した。ここでは新たに57H変異遺伝子を同定したので報告する。

【材料及び方法】水稲品種「台中65号」のMNU処理によって得た57H変異体EM939及び既報の57H変異遺伝子標識系統を用いた。

種子貯蔵タンパク質はSDS-PAGEにより分析した。57kDポリペプチドは抗グルテリン抗体を用い、ウエスタンブロットにより分析した。EM939を原品種、既報の57H変異遺伝子標識系統及び三染色体植物と交配し、得られたF₁及びF₂種子を分析した。

【結果及び考察】SDS-PAGE分析の結果、EM939は57kDポリペプチドの増加(57H)、40kD及び20kDグルテリンの減少(40L、20L)と共に、26kDグロブリン及び13kDプロラミンの減少(26L、13L)を示した。ウエスタンブロット分析の結果、EM939に蓄積する57kDポリペプチドは抗グルテリン α 及び β サブユニット両抗体と強く反応したことから、グルテリン前駆体であることが明らかとなった。

台中65号との交配F₁及びF₂種子を分析した結果、正逆交配F₁はいずれも野生型を示し、かつ、F₂では野生型：EM939型(57H、40L、20L、26L、13L)が3：1に適合する分離を示した。これらの結果は、EM939のグルテリン前駆体の蓄積は単劣性遺伝子に制御され、他の貯蔵タ

ンパク質の変異もこの遺伝子の多面発現作用に起因することを示している。

EM939を既報の57H変異遺伝子標識系統と交配し、同座性検定及び遺伝子間相互作用の解析を行った(Table 1)。*esp 2*、*glup 2*、*glup 3*及び*glup 4*各変異体との組み合わせF₁は野生型を示し、*Glup 1*及び*Glup 5*各変異体との組合せF₁は57H型を示した。F₂では、全ての組み合わせで野生型の分離が認められた。この結果は、EM939の57H変異が既報の6つの57H変異遺伝子座と異なる遺伝子座の変異によることを示しており、そこで、*glup 6(t)*と命名した。*esp 2*及び*glup 3*変異体とのF₂では、野生型、*esp 2*型/*glup 3*型、*glup 6*型及び両親型より顕著にグルテリン前駆体が増加した相加的両劣性型の4タイプが認められ、9：3：3：1の期待比に適合する分離を示した。*Glup 1*とのF₂では、*Glup 1*型、野生型及び*glup 6*型の3タイプが認められ、9：3：4の期待比に適合する分離を示した。*glup 2*とのF₂では、野生型：*glup 2*型：*glup 6*型が9：3：4の期待比に適合する分離を示した。*glup 4*とのF₂では、57H型の区別がつかず、野生型：両親型：相加的両劣性型が9：6：1の期待比に適合する分離を示した。*Glup 5*とのF₂では、野生型：両親型：不完全の57H型が3：7：6の期待比に適合する分離を示した。これらの結果は、*glup 6*遺伝子は*esp 2*、*glup 3*、*glup 4*遺伝子と相加的効果を有し、*Glup 1*及び*glup 2*遺伝子に対し上位であることを示している。

三染色体分析を行った結果、Triplo 4~12との組合せは正常型：57H型が3：1に適合する分離を示した。したがって、*glup 6*遺伝子は染色体1~3のいずれかに座乗すると考えられる。

Table 1. Segregation of the respective phenotypes in F₂ seeds from the crosses between EM939 and the marker lines for each of 57H mutant gene, *esp 2*, *Glup 1*, *glup 2*, *glup 3*, *glup 4* and *Glup 5*.

Cross comb.	F ₁ seeds	Segregation in F ₂				Total	χ^2
							$\chi^2_{(9:3:3:1)(9:3:4)(9:6:1)(3:7:6)}$
EM939 × <i>esp 2</i>	Wild type	Wild type 171	EM939 type 54	<i>esp 2</i> type 50	Additive type 17	292	0.79
EM939 × <i>Glup 1</i>	57H	Wild type 36	EM939 type 44		<i>Glup 1</i> type 98	178	0.26
EM939 × <i>glup 2</i>	Wild type	Wild type 92	EM939 type 51		<i>glup 2</i> type 36	179	1.80
EM939 × <i>glup 3</i>	Wild type	Wild type 101	EM939 type 43	<i>glup 3</i> type 41	Additive type 15	200	2.81
EM939 × <i>glup 4</i>	Wild type	Wild type 64	EM939/ <i>glup 4</i> type 47		Additive type 9	120	0.57
EM939 × <i>Glup 5</i>	57H	Wild type 50	EM939/ <i>Glup 5</i> type 132	Incomplete 57H type 94		276	1.98

447 ° 竹本陽子・熊丸敏博・小川雅広*・佐藤 光 (九大農、*山口県大生活科学)

イネ57H変異遺伝子 *glup 4* の組織学的解析

Y. TAKEMOTO, T. KUMAMARU, H. SATOH and M. OGAWA* (Fac. Agr., Kyushu U., Dep. Life Sci., Yamaguchi Pre. U.) Histochemical analysis of the developing endosperm of a 57H mutant, *glup 4*, in rice.

イネグルテリンはER上で57kD前駆体として合成された後、液胞へ輸送され成熟型の α 及び β サブユニットに開裂し、蓄積してPB-IIを形成する。一方、プロラミンは小胞体内に蓄積してPB-Iを形成する。57H変異体はグルテリンの輸送および限定分解を制御する遺伝子変異することによってプロセスされない前駆体を蓄積し、結果として正常なPBの形成が阻害される。今回は新たに同定された*glup 4*遺伝子のグルテリンの輸送・蓄積のカスケードにおける作用段階を解明することを目的として、*glup 4*変異体のグルテリン前駆体の蓄積部位を解析した結果を報告する。

【材料及び方法】MNU処理によって得た*glup 4*変異体EM 956及び原品種「台中65号」を用いた。

ショ糖密度勾配(SDG)遠心分離法; 46-64%のSDGを用い、登熟種子より調製したPBフラクションを36,000rpmで1時間20分遠心後、分画した。電子顕微鏡観察; 開花後20日の登熟種子をエポキシ樹脂を用いて包埋した。免疫標識; 一次抗体にグルテリン α サブユニット抗体及びプロラミン抗体を用いた。

【結果及び考察】SDG遠心分画分析の結果、前駆体はプロラミンと同じフラクションに分画され、成熟型グルテリンとは異なるピークを示した。このことは、*glup 4*変異体では57kD前駆体の蓄積部位がプロラミンと同一である可能性を示している。次に*glup 4*変異体に存在するPBの観察を行った。*glup 4*変異体では、野生型と同様の内部に年輪様構造を持ち表面にポリゾームが付着した直径1-2 μ mのPB-Iと、野生型に比較し小型のPB-IIが観察された。PB内でのグルテリン及びプロラミンの局在性を明らかにするために免疫染色を行った(Fig.1)。グルテリン抗体を用いた場合、PB-IIと共にPB-Iが標識された。一方、プロラミン抗体を用いた場合、PB-Iのみが標識された。以上の結果は、*glup 4*変異体に蓄積する前駆体は、プロラミンと共にER由来のPB-IIに蓄積することを示している。

このように、*glup 4*変異体に蓄積する前駆体は、既報の*esp 2*、*Glup 1*、*glup 2*変異体と同様にER由来の変異体型PBに蓄積する。しかし、その蓄積状態は大きく異なると考えられる。*esp 2*変異体の前駆体はプロ

ミンとS-S結合した状態で蓄積し、*Glup 1*及び*glup 2*変異体では、前駆体はER内でプロラミンとは別々の顆粒を形成して蓄積している。ところが溶媒抽出の結果、*glup 4*変異体の前駆体はPB-I内に分散するが、*esp 2*変異体とは異なりプロラミンと結合することなく蓄積していることが示唆された。以上のことから、*glup 4*遺伝子は、グルテリン前駆体の輸送・蓄積のカスケードにおいて、既報の4遺伝子とは異なる段階を阻害すると示唆される。前報で*glup 4*遺伝子は*esp 2*遺伝子と相加的に作用することが示されており、*glup 4*遺伝子はグルテリンの輸送・蓄積のカスケードの極めて初期段階に作用すると考えられる。

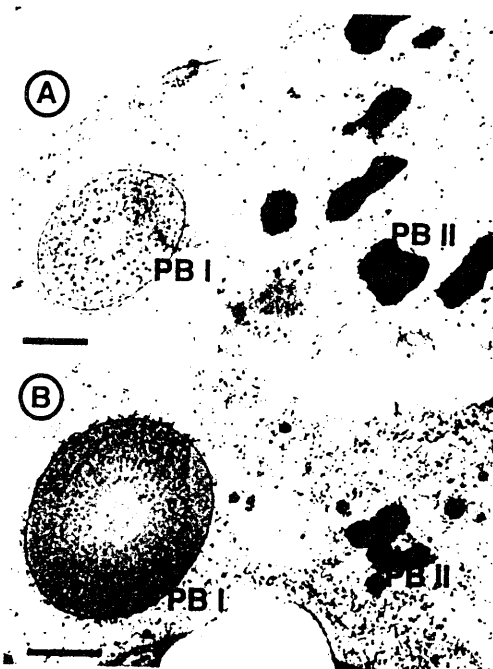


Fig.1 Immunogold labeling of the developing *glup 4* endosperm by anti glutelin and anti prolamin antibodies. Panel A: anti glutelin basic subunit antibody, B: anti prolamin polypeptide antibody. Bar=500nm

616 ○春原英彦¹・佐藤光²・長戸康郎¹ (1. 東大農学生命科学, 2. 九大農) イネ短穂変異体の発生的解析

Sunohara, H.¹, H. Satoh² and Y. Nagato¹ (1. Grad. Sch. Agr. Life Sci., U. Tokyo, 2. Fac. Agr., Kyushu U.)
Developmental analysis of short panicle mutants in rice.

穂の形やサイズは重要な農業形質でありながら、その制御機構についてはほとんど明らかになっていない。我々は、穂の長さ(穂首～穂軸先端)に注目し、短穂変異体について解析を行った。イネ品種台中65号をMNU処理した後代から得られた短穂変異体9系統を用いた。いずれの穂長も野生型の65%以下である(図1)。

穂軸は他の器官と同様に、節と節間から成るファイトマーを構成単位としている。即ち、穂の長さの変異は、穂軸節間の数及び長さの変異として理解できる。そこで、穂軸節間の数と長さに基づいて、9系統を分類したところ、A. 穂軸節間長が短く、節間数も減少している(3系統)、B. 穂軸節間長は短い、節間数は野生型とほぼ同じ(4系統)、C. 穂軸節間長は野生型とほぼ同じだが、節間数は減少している(2系統)、という3グループに分けることができた(図2)。特に、グループAの穂長の短化は顕著であった。これらのグループごとに、穂軸以外の穂の形質について調査した。

基部の4本の一次枝梗について、一次枝梗長・一次枝梗節間長・一次枝梗節間数を調べた。一次枝梗節間長では、全ての変異体で短化が見られたが、グ

ループBの短化が顕著であった。また、一次枝梗長・一次枝梗節間数は全体的に減少しているが、グループ間で差違は無かった。これらの結果は、穂軸の短化は、一次枝梗節間長・数の短化・減少をもたらすことを示唆している。

また、茎頂分裂組織に特異的な発現を示す*OSHI*を用いた*in situ* hybridizationを、グループA及びBの4系統の一次枝梗分化期の幼穂に対して行った。野生型では、二次枝梗分化期に分裂組織での*OSHI*の発現が見られなくなるが、供試したもののうち3系統では野生型とほぼ同じ時期に発現が無くなった。つまり、これらの系統では、穂軸先端の分裂組織が活性を失う時期は、穂のサイズの決定には関与していないことを示唆している。グループBの1系統では、野生型よりも早期に穂軸先端での発現が消失し、穂軸先端の失活の早晩が、穂のサイズの決定に何らかの役割も持つ可能性を示唆している。

以上の解析より、穂のサイズの決定には、多様な制御機構が働いていること、また、穂軸先端の失活のタイミングも穂のサイズに関与している可能性も示唆された。



図1. 野生型と短穂変異体の穂。
(左からT65(野生型)、TCM2830(グループA)、TCM2084(グループB)、TCM2902(グループC))

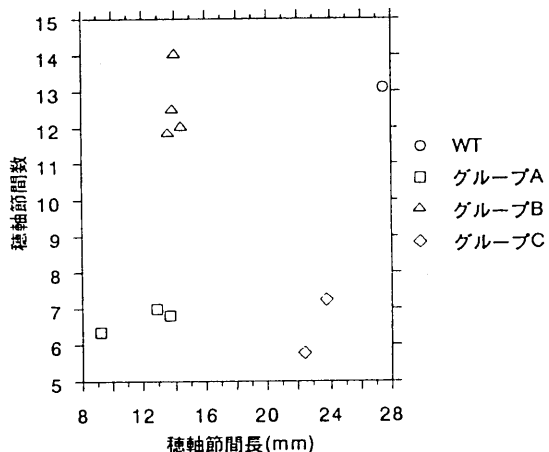


図2. 穂軸節間の長さとの数による短穂変異体の分類。

617 ○林田恵美¹、佐藤 光²、長戸康郎¹ (1. 東大農学生命科学、2. 九大農) イネADL遺伝子は葉の表裏決定に関与する
 HAYASHIDA, E.¹, H. SATOH², Y. NAGATO¹ (1. Grad. Sch. Agric. Life Sci., U. Tokyo, 2. Fac. Agric., Kyushu U.) ADL genes are associated with adaxial-abaxial patterning in rice leaves.

葉の形は重要な農業形質であるばかりでなく、生物学的にも興味深いため古くから研究されてきた。葉の表裏の分化については、最近シロイヌナズナやトウモロコシなどから、表裏のパターンに異常を示すと考えられる変異体が同定されている。しかしながら、それらの遺伝子が発生学的にどのように機能して表裏が決定されるのかについては、未だに明らかになっていない。それを明らかにするには変異体の表現型の詳細な解析が最も有効な手段である。

イネ突然変異体*adl1* (*adaxialized leaf 1*) は、葉身が逆に巻く変異体として同定され、さらに葉身の表側のみに分化する機動細胞が裏側にも存在していたため、その原因遺伝子は葉の表裏の分化を制御するものと考えられる。この変異体については前回98T-4s-24として発表したが、今回表裏の分化に関わる新たな変異体を単離したので報告する。

イネ品種台中65号の受精卵にMNU処理した後代から*adl1*とは別の遺伝子座の劣性の変異体*adl2*を単離した。*adl2*も*adl1*と同じく表側のマーカーである機動細胞が両面に分化し、葉肉細胞が維管束の裏側に入り込み葉脈様の突出を裏側に向かって形成する(図1)。しかしながら*adl2*は*adl1*よりさらにわい性が強く、また出穂せずに枯死してしまう。

adl1、*adl2*ともに裏側表皮の表側化は明らかであるが、内部の葉肉細胞については異常は認められるものの、その表-裏性については明らかでなかった。そこで、葉肉細胞の表現型が表裏で異なる変異体をスクリーニングした。

TCM2380は、表側半分の葉肉細胞のほとんどで葉緑体が分化しないが、裏側の葉肉細胞では正常に分化する。そのため外観上葉の表側は白っぽく、裏側は緑色になる。従ってTCM2380は葉肉細胞の表側のマーカー遺伝子と考えられる。葉緑体分化以外の表現型は野生型とほぼ同じであった。そこで*adl2*の葉肉細胞の表-裏性を明らかにするためにTCM2380と*adl2*の二重変異体を作成したところ、葉緑体を分化しない細胞が葉肉全体に分布した。即ち*adl2*では表皮だけでなく葉肉細胞も裏側が欠失し、表側化したと考えられる。

また*adl1*では葉原基が野生型よりも茎頂分裂組織の先端側から分化した。*adl2*の茎頂を透明化法等を用いて観察したところ、多少の変異はあるものの*adl1*と同様に、茎頂分裂組織の先端側から葉原基の分化が見られた(図2)。

以上の結果から、少なくとも*adl2*では表皮だけでなく内部の葉肉細胞も全て表側になっており、ADL遺伝子がたしかに葉身の表裏分化を制御していることが明らかになった。また変異体*adl1*と*adl2*の両方で茎頂における葉原基発生位置に同様の異常が見られたことから、葉原基の発生位置が葉の表裏分化に関連することが強く示唆された。



図1. 葉身の横断切片。
 A. 野生型。B. *adl2*。

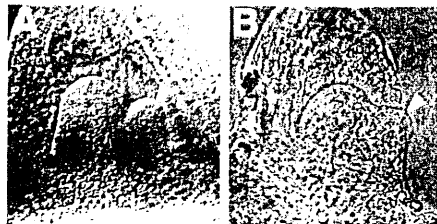


図2. 茎頂分裂組織からの葉原基(矢頭)の分化。
 A. 野生型。B. *adl2*。

BIOSYNTHESIS OF RICE S-POOR AND S-RICH PROLAMINS ARE REGULATED BY INDEPENDENT GENETIC SYSTEM

H. Matsusaka¹, T. Kumamaru¹, M. Ogawa², and H. Satoh¹

¹Lab. of Plant Genetic Resources Institute of Genetic Resources, Kyushu University, Fukuoka 8128581, Japan; ²Fac. Home Econ., Yamaguchi Pref. University, Yamaguchi 753, Japan

Polypeptides constructing rice prolamins are synthesized on the endoplasmic reticulum and accumulated in the spherical protein body type (PB-). Although it has been suggested that there are many structural genes for rice prolamins, it is not revealed what kind of and how many genes involve in the regulation for the synthesis and the accumulation process of rice prolamin polypeptides. To make clear the genetic regulation mechanism of prolamin biosynthesis, we tried to isolate novel mutants by the MNU treatment and the detailed analyses of genetical and biochemical properties was carried out.

116 prolamin mutants were newly obtained by the MNU treatment with Taichung 65. Prolamins in original variety Kinmaze were separated into four polypeptide band groups distributed from 16 to 10 kD, that is, 16, 15(13a), 13 (13b) and 10 kD bands, by SDS-PAGE. These mutants were classified into two groups which subdivided 5 types based on the SDS-PAGE band patterns. One group (group A) containing 2 types was characterized by a remarkable decrease of 13b polypeptide, and the other group (group B) having 3 types by a significant reduction of 13a polypeptides with large amount of 13b polypeptide. Two novel types of mutants were found in addition to 3 types of mutants reported previously (Kumamaru et al. 1988), both of which belonged to group B. Although prolamins have classified into S-poor and S-rich according to the difference of solvent solubility (Ogawa et al. 1987), most of 13b polypeptides were S-poor prolamin, while 10 kD, 13a and 16 kD polypeptides were S-rich prolamin in Kinmaze. Thus it is considered that group A is mutants for S-poor prolamin and group B is those of S-rich prolamin. Based on the band patterns of isoelectric focusing known as useful method to detect microheterogeneity, these mutants were also classified into two groups, which completely corresponded to above-mentioned two groups. As was expected, S-poor prolamin level in group A, S-rich prolamin level in group B decreased respectively, but there is no novel band with distinct pls.

All of the mutants newly induced were controlled by single genes. Because of the simultaneous change of prolamin polypeptides encoded by different structural genes, it was concluded that these mutant genes involved in the regulation of the prolamin biosynthesis and/or the accumulation into PB-. Thus it is possible to assume that there are at least two different regulation mechanisms for the synthesis and the deposition in PB-, in which one involves in S-poor prolamin regulation and the other in S-rich prolamin regulation, and that more than two or three independent genes involve in each of the regulatory pathway.

GENETIC DIVERSITY IN SEED STORAGE PROTEINS OF BANGLADESH RICE CULTIVARS

M.S. Jahan, T. Kumamaru, and H. Satoh
Laboratory of Plant Genetic Resources, Faculty of Agriculture, Kyushu University,
Fukuoka 812, Japan

With a view to obtain the diversity for its possible utilization in the quantitative and qualitative improvement of rice, Bangladesh rice genetic resources collected from different parts of the country were screened for seed storage proteins.

A total of 467 lines stocked in the Laboratory of Plant Genetic Resources, Kyushu University, Japan were analyzed for endosperm storage proteins by the comparison with japonica and indica varieties 'Kinmaze' and 'IR36' respectively as standard varieties. The screening was done by observing the profiles of SDS-PAGE.

A wide variation in banding pattern was observed in SDS-PAGE of Bangladesh rice cultivars. In glutelin acidic subunit, 10 types of variation were detected based on apparent molecular weight (mobility) and staining intensity of polypeptide bands. They were 0.21%, 0.64%, 74.52%, 15.20%, 83.30% and 1.50% of the total accessions.

In case of prolamins, a wide variation was also recorded on the basis of banding pattern. The standard varieties indicate 2 major prolamin bands, 13 kD and 15 kD. In Bangladesh rice cultivars, 4 tentative groups like 13-15 kD type, 14-15 kD type, 15 kD type and 13-14-15 kD type were recorded. Their observed frequencies were 78.37%, 11.35%, 2.78% and 7.48% respectively. In each type, one or more sub-groups were also identified depending on the staining intensity of the polypeptide bands.

The variations recorded in SDS-PAGE analysis may serve as useful material for further genetic and biochemical analysis and improvement of endosperm storage protein of rice through breeding, though the details are under investigation.

GENETIC VARIATION IN STORAGE PROTEIN AND STORAGE ENDOSPERM STARCH IN MYANMAR LOCAL RICE CULTIVARS.

P. P. Aung, T. Kumamaru, and H. Satoh

Lab. of Plant Genetic Resources, Institute of Genetic Resources, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Hakozaki, Fukuoka, 812 Japan

Genetic variation in storage protein and storage endosperm starch is important for many genetic and breeding purposes. One hundred and fifty local rice cultivars collected from six distinct regions of Myanmar were analyzed for variation in seed storage protein (glutelin and prolamin) by SDS-PAGE. Their protein profiles were compared with standard varieties, Kinmaze and IR36. 4 types of variations in glutelin subunit were found on the migration distance of \pm -3 subunit and the peak density type, characterized by type 1; fast migration of \pm -3 and high intensity of \pm -2 band, type-2; fast migration of \pm -3 and high intensity of \pm -1,2,3 bands, type-3; slow migration of \pm -3 and low intensity of \pm -1,2,3 bands, type-4; slow migration of \pm -3 and high intensity of \pm -1,2,3 bands. Their respective frequencies were 36.7% ,6.66% ,12.66% and 43.98% of total cultivars. A wide variation in IEF band pattern was found according to their isoelectric point and staining intensity. IEF analysis showed that Myanmar local rice cultivars had up to 14 and 8 bands for glutelin \pm and²subunit, respectively. The variation in prolamin polypeptides were observed based on the intensity of 13a (larger component of 13kDa) and 13b (smaller component of 13kDa) in SDS-PAGE profiles, which were grouped to the 5 types, namely, type A was characterized by high intensity of both the 13a and 13b bands (13a,b H), type B dominated only high intensity of 13b(13b H) and type C possessed only high intensity of 13a (13a H), type D showed low intensity at both these bands(13a,b L) and in type-E 13b band was absent. Their frequencies were 17.99%, 8.67% , 28.67%, 23.99% and 20.68% of total cultivars, respectively. 3 different types of 60kDa band (Waxy protein) were detected, based on their intensity, i.e. high, low and absent. The relative frequency of these were 79.34% ,15.99% and 4.67%, respectively.

Alkali digestibility score is also a good indicator determining the cooking quality due to close linkage with the gelatinization temperature of starch. The alkali digestibility score of Myanmar rice cultivars distributed from 1 to 7, of which 94 cultivars (62.66%) possessed low alkali digestibility (score 1 to 3), while 53 cultivars (35.33%) had intermediate (score 4 to 6) and 3 cultivars (1.99%) belonged to high alkali digestibility (score 7 to 9), respectively.

VARIATION IN THE SEED STORAGE PROTEINS IN PAKISTAN RICE GERMPLASM

Sadar Uddin Siddiqui, Hikaru Satoh, and Toshihiro Kumamaru
Laboratory of Plant Genetic Resources, Faculty of Agriculture, Kyushu
University, Fukuoka, Japan

Rice is the second most important crop in Pakistan; both in terms of local consumption and export. In order to ascertain the diversity for its possible utilization in rice improvement, Pakistan local rice genetic resources (A total of 475 accessions, obtained from MAFF genebank), collected from 3 rice cultivation zones and other parts of the country were investigated for the variation in the seed storage proteins using SDS-PAGE and IEF analyses. The distribution pattern of some interesting observations were also carried out. A wide variation exists in Pakistan local rice cultivars for the two major storage proteins i.e. glutelin and prolamin. In case of prolamins four types of variation were recorded by SDS-PAGE, while in case of the glutelin, the proglutelin which is a 57 kD polypeptide showed 2 types of variation in the SDS-PAGE analysis and 6 types of variation in the mature glutelin was revealed, in comparison to IR36 and Taichung 65. The variation for glutelin was also analyzed by IEF. 12 types of variation were observed, based on the intensity and presence or absence of the respective bands. The distribution pattern of high 57 kD polypeptide (57H) spontaneous mutants seemed to be restricted in location and altitude showing a high degree of correlation in terms of altitudinal and geographical occurrence. 89.4% mutants were distributed in low altitude range areas of the Punjab region. The 57H mutation prevailing in Pakistan rice genetic resources was found to be controlled by a single recessive gene i.e. *glup3* gene, this gene was found to be located between RFLP markers C1238 and R2370 within 5.3cM of distance on chromosome 4. The observed variation for low prolamin and the glutelin variation may be useful in improving the nutritional value of rice.

Key words: Rice, Storage protein, Glutelin, Prolamin, 57H mutant, Pakistan, Genetic resources, Diversity, Distribution, SDS-PAGE, IEF, RFLP.

HYPOTHETICAL MODEL OF GENETIC REGULATION OF GLUTELIN BIOSYNTHESIS PATHWAY

Yoko Takemoto¹, Masahiro Ogawa², Toshihiro Kumamaru¹, Thomas W. Okita³, and Hikaru Satoh¹

¹Fac.Agr.Kyusyu U., ²Fac.Home Econ. Yamaguchi P.U., ³IBC.WSU. USA

Glutelins, major storage protein, are synthesized as 57kD glutelin precursor on the ER, transported into the vacuole, cleaved into mature glutelin subunits and accumulated in the vacuole (PBII). Prolamins, minor storage protein, are synthesized on the ER and stored as protein body within the ER(PBI). For the purpose of studying the genetic regulation of glutelin biosynthesis pathway, we induced the highly accumulated 57kD glutelin precursor mutant (57H mutant) and characterized four 57H mutants, esp2, Glup1, glup2 and glup3.

Electronmicroscopic observation showed that glutelin precursor in esp2, Glup1 and glup2 were deposited in the mutant type PB derived from ER. Glutelin precursor and prolamin were mixed in the mutant type PB, both protein in Glup 1 and glup2 were distributed separately in the PB. The glutelin precursors in glup3 was deposited in the PBII with mature glutelin subunits.

Glutelin extraction under several conditions indicates that the glutelin precursor and prolamin polypeptides aggregate by interchain S-S bond in esp2.

Western blot analysis demonstrated that esp2 contained BiP and calnexin but lacked protein disulfide isomerase (PDI). In esp2, it is considered that the absence of PDI caused the glutelin precursor retention in the ER by irregular S-S bond with prolamin polypeptides. Partial cDNA clone of PDI was isolated and sequenced. The PDI clone possessed a thioleodoxin site and ER retention signal, KEDL at C-terminal. Comparison of deduced amino acid sequence of PDIs from maize, wheat and barley showed that it shared 84.2% to 84.9% identity.

We construct hypothetical model of genetic regulation of glutelin biosynthesis pathway. Esp2 gene regulates the expression of PDI which plays an essential role in the segregation of glutelin precursor and prolamin polypeptides in the ER. glup1 and Glup2 genes possibly control the transportation from ER to vacuole. Glup3 gene regulated the cleavage of glutelin precursor in the vacuole.

EFFECT OF STARCH-BRANCHING ENZYME IIb ON THE AMYLOPECTIN STRUCTURE AND GELATINIZATION PROPERTY

Aiko Nishi¹, Yasunori Nakamura², and Hikaru Satoh¹

¹Faculty of Agriculture, Kyushu University, Fukuoka 812-8581, Japan, ²Faculty of Bioresource Sciences, Akita Prefectural University, Akita 010-0195, Japan

Starch is the major carbohydrate reserve material in rice endosperm. It is composed of two types of molecules; amylose and amylopectin. The rheological properties of starch granules are affected by amylose/amylopectin ratio and amylopectin structure. The purpose in this study is to examine whether the starch structure and gelatinization property can be manipulated genetically. We investigated the relationships among the gelatinization properties, the amylopectin structure and enzymes involved in starch synthesis by using the mutant.

To make clear these relationship, we tried to induce mutation for the *ae* locus by the MNU treatment and screened various kinds of allelic *ae* mutants different in starch properties. In addition, to clarify the effect of the amount of starch-branching enzyme IIb (BEIIb) on the gelatinization property, we made the F1 seeds with different dose of *ae* allele by crossing in reciprocal manner.

The gelatinization properties of endosperm starches from *ae* and amylose-free *ae* mutant (*aewx*) lines were examined by using urea solution. In all *ae* and *aewx* mutants, the starch granules were more resistant to gelatinization with urea solution than those of wild-type. This result indicated that the resistance of *ae* starch granules to urea depend on the amylopectin structure. The amylopectin structure was determined by HPAEC-PAD method. In all *ae* mutants, the short chains with DP_f17 were specifically decreased, with the remarkable decrease in chains with DP 8 to 12. Lowering the short chains was highly correlated to the gelatinization properties of the starch granules measured by their solubility into the urea solution.

Biochemical analysis of various allelic *ae* mutants of rice revealed that they were mutation in the gene coding for BEIIb. In the dosage experiments, the amount of BEIIb was increased with dose of *Ae* gene. The proportion of short chains with DP_f17 and the solubility of starch granules to urea solution were similarly increased with increased dose of *Ae* gene. In the F2 population, the segregation between the deficiency of BEIIb and the less gelatinization to urea was not observed. Based on these results, we conclude that BEIIb is encoded by the *Ae* gene, and it plays the major role on the formation of short chains with DP_f17 included in a cluster of amylopectin molecule. In addition, the reduction of short chains with DP_f17 in the *ae* mutants lead to the insolubility of *ae* starch granules to urea solution.

日本農芸化学会大会（東京） 4月、2000年

2F007^α 新規高度好熱菌 *Thermus otakeensis* の同定

○川津領一、稲垣史生、土居克実、緒方靖哉（九大農・遺資研）

【目的】地底から湧出する地熱水中には、高濃度のシリカが溶存している。地熱水を利用する地熱発電所では、パイプラインなどの地上設備にシリカスケールが沈着形成し、操業トラブルの一因となっている*1)。また、*Thermus* 属菌株はシリカスケールに生息する微生物の中で優占種であり、*in vitro* でシリカの凝集作用が認められている*2)。本研究では、大分県大岳地熱発電所の滞留槽（85±2℃、pH7.2）にて形成したシリカスケールより分離された、高度好熱菌 TMY 株の同定を目的とした。

【方法及び結果】TMY 株は 50~88℃で生育可能なグラム陰性の好気性細菌であり、その最適生育温度は 75℃、最適生育 pH は 8.0 であった。透過型電子顕微鏡観察によって、本菌は長さ約 3~7 μm、幅約 0.5~1 μm の桿菌であり、繊毛様器官の存在と、一部の細胞の末端側に径 0.5 μm 以下の small sphere あるいは cell の形成が認められた。TMY 株は黄色のカロテノイド色素を産生し、この吸収スペクトルは *T. thermophilus* HB8^T株のそれに類似していた。また、本菌株は、HB8^T株と同様にオキシダーゼ、カタラーゼ、ゼラチナーゼ、リパーゼを菌体外に分泌するが、HB8^T株の資化不能なガラクトース、ソルビトール、マンノース、酢酸、ピルビン酸を資化した。菌体脂肪酸組成は、*Thermus* 属菌株に特異的な iso 15:0 と iso 17:0 であり、全脂肪酸の約 80%を占めていた。本菌株の GC 含量は 66 mol%であり、16S rDNA の塩基配列は HB8^T株と 15 塩基異なっていた。特に、*Thermus* 属の 16S rDNA の種特異的領域（helices -6, -10, -18）において、TMY 株は HB8 株と 5 塩基の相違が認められた。上記の結果から、TMY 株が新規の *Thermus* 属菌株であると判断し、*T. otakeensis* と命名した。

*1) 稲垣史生、緒方靖哉：バイオサイエンスとインダストリー、57、34-35 (1999)

日本農芸化学会大会（東京） 4月、2000年

2F354 B

タイの発酵食品より単離した乳酸菌の生産する

バクテリオシンの精製

上中和代、島 純、森勝美、○大桃定洋*、緒方靖哉**
農水省食総研、*農水省畜試、**九大・農

（目的）タイの発酵食品から単離した乳酸菌 K-4 株は *Enterococcus faecium* に対する抗菌性物質（バクテリオシン）を生産する。そこで、本研究では K-4 株の生産するバクテリオシンを生化学的に精製し、化学構造を決定することを目的に研究を行った。

（方法・結果）まず、K-4 株の分類学的同定を行った。16S rDNA シーケンス及び DNA-DNA ハイブリダイゼーションにより、K-4 株は *Enterococcus faecalis* と同定された。次に、バクテリオシンの精製を行った。K-4 株培養液の pH を 6 に調整し、バクテリオシンを菌体に吸着させた後、遠心分離により上清を取り除いた。その後、菌体から 0.1% Brij-35、1 M NaCl を含む緩衝液（pH 2）で活性物質を抽出した。抽出液を濃縮後、ODS 逆相クロマトグラフィーを行った。活性画分を SDS-PAGE で分離したところ、約 5000Da の分子量を示す単一バンドが検出され、かつバイオアッセイの結果、抗菌活性を有していることが認められた。現在、大量調製法の確立及び構造解析を行っているところである。

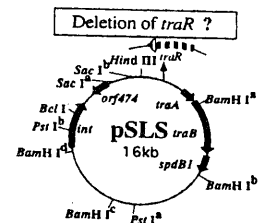
日本農芸化学会大会 (東京) 4月、2000年

2F148β

*Streptomyces laurentii*の接合性プラスミドpSLSの遺伝子解析
○酒見博士, Mangkorn Rodpra pakorn, 横山英之, 土居克実, 緒方靖哉
(九大農・遺資研)

【目的】本研究は、*Streptomyces laurentii* ATCC31255の孢子形成を阻害する接合性プラスミドpSLS上の遺伝子の構造と機能を明らかにすることを目的としている。

【方法と結果】pSLS制限酵素地図のHindIII-BamHI^a断片の塩基配列を解析した。その結果、*traB*の上流から、放線菌の接合性プラスミドpJV1やpSN22の菌糸間伝達機能を有する遺伝子*traA*と高い相同性をもつ遺伝子を同定した。また、pSLSの*traA*、*traB*、*spdB1*遺伝子の配置と向きは、pSN22およびpJV1と非常に類似していた。しかし、pSN22およびpJV1では、*traA*や*traB* (*kil*) の機能を抑制する*traR* (*kor*) 遺伝子が*traA*の上流に存在するが、pSLSではこれに相当するORFが検出できなかった。pSLSの強い孢子形成阻害は、*traR*の領域が欠落したためと推定した。また、pSLSの孢子形成阻害が線状プラスミドpSLLの共存によって抑制されることから、*) pSLSの*traA*や*traB*の機能抑制にpSLLが関与していると考えられた。



*) Iramina et al., *Biosci. Biotech. Biochem.*, 61, 1469-1473 (1997)

日本農芸化学会大会 (東京) 4月、2000年

2F149α

Streptomyces lividans TK24 のヒストン様タンパク質
○横山英之, 土居克実, 緒方靖哉 (九大・遺資開研)

【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ち、また、形態分化の過程で、多核の菌糸から単核の孢子が生じる。しかし、放線菌におけるDNAの構造維持、複製及び分配には不明な点が多い。著者らは、これまでにDNAの複製や構造維持等に関与するヒストン様タンパク質と相同性の高いタンパク質HSIを*Streptomyces lividans* TK24から分離し、その遺伝子*hup*をクローニングしている(*FEMS Microbiol. Lett.* 138, 197-200; *Biochim. Biophys. Acta* 1353, 103-106)。本大会では、新たにヒストン様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。

【方法と結果】ヒストン様タンパク質のDNA結合に関わる保存配列をコードする部分の*hup*の塩基配列 (5'-CGCACCGCCCCGCAACCCGCGAGACC) をプローブとして、TK24のゲノムライブラリーから、新たにヒストン様タンパク質をコードする遺伝子*hup2*をクローニングした。*hup2*がコードするHSI2の推定アミノ酸配列は、DNA結合に関わる保存配列を保持し、*Mycobacterium smegmatis*のHlpタンパク質のアミノ酸配列と高い相同性を示した。HSIや他のヒストン様タンパク質が100アミノ酸残基程度に対して、HSI2とHlpは、約200アミノ酸残基であった。HSI2と既知のヒストン様タンパク質のアミノ酸配列でClustalWを用いてアライメントを作製し、UPGMA法によって系統解析を行った。その結果、HSI2は、HSIとは比較的系統的に離れていることが示唆された。

P-20 *Streptomyces lividans* TK24のヒストン様タンパク質

○横山英之、土居克実、木村誠⁺、緒方靖哉

（九大院・農学研究院・遺資研・⁺生物化学）

【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ち、また、形態分化の過程で、多核の菌糸から単核の胞子が生じる。しかし、そのDNAの構造維持、複製および分配には不明な点が多い。当研究室では、これまでにDNAの複製や構造維持等に関与するヒストン様タンパク質と相同性の高いタンパク質HSIを*S. lividans* TK24から分離し、その遺伝子*hup*をクローニングしている(*FEMS Microbiol. Lett.* 138, 197-200; *Biochim. Biophys. Acta* 1353, 103-106)。本大会では、*hup*破壊株の構築およびHSIとは別種のヒストン様タンパク質HSI2をコードする遺伝子*hup2*のクローニングについて報告する。

【方法と結果】

HSIタンパク質のDNA結合に関わるアーム領域をコードしている*hup*遺伝子の後半部分とカナマイシン耐性遺伝子*kan*とを交換した*hup*破壊株（EY1-EY6）を構築した。得られた*hup*破壊株EY1は、カナマイシン非存在下で2代の胞子形成を行なっても、カナマイシン耐性を失わなかった。カナマイシンの影響を除くために、カナマイシン非存在下での培養でも、EY1は固体培地上で正常に胞子形成を行ない、親株のTK24との差異は認められなかった。しかし、液体培地中では、TK24よりも生育が遅れた。この生育の遅延は、ローコピーベクターpRES18に完全な*hup*を組み込んだpRES-*hup*の導入により回復した。最終湿重量は、TK24、EY1およびpRES-*hup*を導入したEY1との間で、有為な差はなかった。また、DAPI染色後に蛍光顕微鏡で観察しても、無核細胞形成等の異常は確認できなかった。

*E. coli*では、HUタンパク質をコードする遺伝子*hupA*と*hupB*両方を破壊した株は無核細胞形成や生育の阻害等が認められるが、片方の遺伝子を破壊しただけでは顕著な表現型を示さない。このことから、TK24には*hup*以外のヒストン様タンパク質をコードする遺伝子が存在すると推定した。ヒストン様タンパク質のDNA結合に関わる保存配列をコードする部分の*hup*の塩基配列（5'-CGCACCGCCCGCAACCCG CAGACC）をプローブとして、TK24のゲノムライブラリーから、新たにヒストン様タンパク質をコードする遺伝子*hup2*をクローニングした。*hup2*がコードするHSI2の推定アミノ酸配列の前半部分は、*B. subtilis*のHBsu等の細菌由来のHU型ヒストン様タンパク質のアミノ酸配列と高い相同性を示し、後半部分は原生生物*Euplotes crassus*のヒストンH1-1等のヒストンH1のアミノ酸配列と高い相同性を有していた。

P-21 接合性プラスミド pSA1.1 の *spi* 遺伝子発現制御機構に関する時間的・空間的解析

土居克実、山内真理子、横山英之、○大山由紀子、緒方靖哉（九大院、農学研究院、遺資研）

【目的】 *Streptomyces azureus* の接合性プラスミド pSA1.1 上の *spi* 遺伝子は他の放線菌接合性プラスミドと同様、プラスミドの菌糸間伝達と宿主の生育阻害に機能し、pSA1.1 上の *imp* オペロンによって制御されていることが推定された。また、*spi* の推定産物 Spi は放線菌プラスミドの Tra タンパク質の他、*B. subtilis* の SpoIIIE や *E. coli* の FtsK などと同様に ATP binding site のコンセンサス配列を有しており、膜を介した DNA 転移に機能していると推定された。本研究では、*spi* 遺伝子の発現の時期と局在性、および、*imp* オペロンによる発現抑制を明確にすることを目的とした。

【方法・結果】 C 末端に His-tag を付加するように設計したプライマーを用いて PCR により、*spi-his-tag* を作製した。これを高コピーベクター pIJ702 と低コピーベクター pRES18 にそれぞれ挿入し、*Streptomyces lividans* TK24 に形質転換し、TK24(pIJ702-*spi-his-tag*)と TK24(pRES18-*spi-his-tag*)を得た。また TK24 株にあらかじめ pSA1.1 を導入した TK24(pSA1.1)にも同様の組換えプラスミドを形質転換し、TK24(pIJ702-*spi-his-tag* / pSA1.1)と TK24(pRES18-*spi-his-tag* / pSA1.1)を得た。これらの形質転換株のうち、TK24(pIJ702-*spi-his-tag*)と TK24(pIJ702-*spi-his-tag* / pSA1.1)は固体培地上および液体培地中での生育が TK24(pRES18-*spi-his-tag*)および TK24(pRES18-*spi-his-tag* / pSA1.1)より遅延していた。これは、pIJ702 中にクローニングした *spi* の遺伝子量が pRES18 中にクローニングした *spi* の遺伝子量を凌駕し、生育を阻害したと推測した。また、どちらのベクターを使用しても、pSA1.1 プラスミドと共存させた場合の生育が良好であることも判った。これは、*spi* の転写が *imp* によって抑制されたためと推測した。

また、pEGFP-N1 を利用して Spi-EGFP 融合タンパク質を産生する遺伝子断片を構築した。本断片を pRES18 中にクローニングして、TK24(pRES18-*spi-egfp*)と TK24(pRES18-*spi-egfp* / pSA1.1)を作出した。これらの形質転換体の位相差蛍光顕微鏡観察によって、Spi-EGFP による蛍光を観察したところ、基底菌糸形成時には、菌糸の局所でごく僅かの蛍光しか観察されなかったが、気菌糸形成時には、菌糸全体で蛍光が検出できた。これは、*spi* が主として気菌糸形成時に菌糸全体で発現していることを示している。さらに、蛍光光度計を用いて、固体培地上および液体培地中の菌体の EGFP 蛍光強度を経時的に測定し、*spi* 発現量を定量的に検討した。

P-22 Phosphoserine Phosphatase-, *minD*-様遺伝子を含む DNA 断片が *Streptomyces azureus* の形態分化へ及ぼす影響

○西山孝、蒲池泰治、酒見博士、土居克実、緒方靖哉

(九大院、農学研究院、遺資研)

【目的】 *S. azureus* BalA1 株は、気菌糸形成能を欠く bald 株で、親株である PK100C 株や *S. laurentii* 等の他菌株に対する生育阻害、また、*S. coelicolor* 等に対しては色素分泌の早期誘発などの性質を示す。BalA1 株が保持する multi copy vector には *S. azureus* の 2.5kb 染色体 DNA 断片が挿入されており、その中には 2 個の ORF が確認された。このうち、推定アミノ酸配列が *Mycobacterium leprae* の phosphoserine phosphatase 様タンパク質と同源性があるものを *pspSA*、*Bacillus subtilis* のセプタ形成に関与するタンパク質 MinD の N 末端部分と同源性があるものを $\Delta minDSA$ と命名した。本研究では、放線菌の形態分化・代謝分化に深く関わっていると推察される 2.5kb 染色体 DNA 断片の解析を行っている。

【方法・結果】 *S. azureus* BalA1 株の特性に大きく寄与していると推察される 2.5kb 断片のコピー数の影響を、low copy vector で、かつ *Streptomyces-E. coli* のシャトルベクターである pRES18 を用いて検討した。まず、pRES18 に *S. azureus* で使用可能な選択マーカーとして、*Streptomyces kanamyceticus* ISP5500 由来のカナマイシン耐性遺伝子を挿入した。次いで 2.5kb 断片を挿入したプラスミドを PK100C 株に形質転換し、サザンハイブリダイゼーションにより確認を行った後、形質転換株の性状を観察した。

本形質転換株の Bennett 固体培地上の菌叢では、弱い気菌糸形成と孢子形成が見られた。一方、Rye 固体培地上での菌叢は、PK100C 株と変わらず全体に気菌糸形成・孢子形成を示し、Rye 培地上でも気菌糸・孢子を形成しない BalA1 株とは大きく異なっていた。これらの現象から、BalA1 株の形態分化抑制には 2.5kb 断片のコピー数の増加が大きく寄与していることが確認された。また、Bennett 培地と Rye 培地において本形質転換株の形態分化に大きな差異が現れたことから、両培地の成分の違いが関与していると考えられた。特に、本形質転換株の形態分化抑制とカタボライト的な抑制との関わりが推察され、抗生物質生産性などの生理学的諸性質と併せて検討を行っている。

4S44 サイレージ乳酸菌のプラスミドの特性と利用開発
（九大院・遺資研¹、農水省²）○土居克実¹、江口智子¹、
島純²、大桃定洋²、緒方靖哉¹

【目的】高温多湿性気候の西南暖地に適応したサイレーシ乳酸菌の作出を目的とし、有用特性を持つ菌株を分離してきた。これら菌株の中には、プラスミドを保持する株が多く見られ、有用特性の幾つかがプラスミド上にコードされていた。本研究では、サイレーシ乳酸菌が保持するプラスミドについて、遺伝子の構造・機能を解明し、これらを利用した高機能サイレーシ乳酸菌の作出を計ることを目的とした。

【方法及び結果】

(1) ファージ耐性に機能するプラスミド

沖縄および九州地域で分離した80種のサイレーシ乳酸菌株に対し、ファージ感受性試験を行ったところ、ファージ耐性を示す菌株が認められた。ファージ耐性を示した *Lactobacillus plantarum* NGRI01010 株には、2種のプラスミド pLKL および pLKS が含まれていた。このうち、pLKS は 2,046bp からなり、3つの ORF が推定された。これらのうち、orf918 は他の乳酸菌プラスミドの rep と高い相同性が認められたが、既に報告されているファージ耐性に関与する遺伝子との相同性は認められなかった。しかし、pLKS のキュアリング株がファージ感受性を示し、pLKS を再導入した株では、ファージ耐性が回復したことなどから、本プラスミドがファージ耐性に関与することが推定された。このファージ耐性機構は Abi の1種ではないかと推定した¹⁾。また、pLKS は小サイズで θ 型複製を行うことが推定されたため、本プラスミドを基にしたサイレーシ乳酸菌-大腸菌シャトルベクターの構築を試みた。一方、pLKL は 6.8kb のプラスミドで、本プラスミドがキュアリングした株は、増殖が極度に遅延することから、宿主の増殖を扶助する遺伝子が座乗している可能性が示唆された。

(2) バクテリオシン生産に機能するプラスミド

タイ国の発酵食品より分離した *Enterococcus faecalis* K-4 株は 40℃ 以上の高温培養条件下でバクテリオシン (enterocin SE-K4) を生産する²⁾。enterocin SE-K4 のアミノ酸配列を決定したところ、bacteriocin31 と高い相同性が認められた。一方、検したところ、enterocin SK-4 は *Enterococcus* 属、*Bacillus* 属、*Clostridium* 属、及び *Listeria monocytogenes* 等に抗菌性が認められ、bacteriocin31 より広い抗菌スペクトルを有する。本株よりプラスミドを分離したところ、pEK4L と pEK4S の2種のプラスミドが検出された。pEK4L 上に enterocin SE-K4 をコードする遺伝子群を検出し、その塩基配列を決定した。本遺伝子から推定されたアミノ酸配列は、enterocin SE-K4 の N 末端アミノ酸配列と一致した。

1) Eguchi et al., *Biosci. Biotech. Biochem.*, **64** (4), 751-756 (2000)

2) 土居克実他、*生物工学会誌*, **77** (11), 472-474 (1999)

Characterization and application of plasmids in lactic acid bacteria.

○Katsumi Doi, Tomoko Eguchi, Jun Shima, Sadahiro Ohmomo and Seiya Ogata (Inst. Genet. Res., Graduate School, Kyushu Univ., MAFF)

【Key words】 Silage, Lactic Acid Bacteria, Plasmid, Phage resistance, Bacteriocin

612

高度好熱菌 *Thermus* 属細菌のシリカ誘導性蛋白質

(九大院・農院・遺資研) ○川津領一、田原美紀、稲垣史生、土居克実、緒方靖哉

【目的】 地熱水中でのシリカ鉱物形成に、好熱性細菌が関与することが明らかになってきた^{1) 2)}。熱水中 (85 ±2℃、pH7.2) で形成された非結晶質のシリカ鉱物 (シリカスケール) から分離した高度好熱菌 *Thermus* 属 TMY 株は、ポリマーシリカを添加した液体培養中で、シリカ鉱物と類似した沈殿物を形成し²⁾、さらに、細胞表面にシリカ誘導性蛋白質 (Sip) を産生する。本研究では、TMY 株の生育に伴う Sip の産生量の変化や、培地中のポリマーシリカ濃度の Sip 産生に及ぼす影響等について検討した。

【方法及び結果】 ポリマーシリカ濃度をメタ珪酸ナトリウムによって調整した培地 (pH7.2) で TMY 株を培養した後、増殖細胞を超音波破壊し、不溶性画分を超遠心によって集め、SDS-PAGE に供して、Sip を分離した。本株による非結晶質シリカ鉱物様の沈殿物は、培養温度 70℃以上で、非結晶質シリカの溶解度 (約 450ppm) を越える過飽和のポリマーシリカが存在する場合に起こった。Sip (分子量約 35kDa、pI 約 9.5) は、沈殿が生じる条件下でのみ誘導産生された。また、Sip は、同条件下で対数増殖期初期 (約 6hr) から産生量が増加し始め、定常期 (約 15hr) に至るまで、産生の増加が認められた。さらに、Sip の産生量は、培地中のポリマーシリカ濃度の上昇に伴って増加した。また、*T. thermophilus* HB8⁺ 株、*T. flavus* AT-62 株においても、Sip 様蛋白質の産生が確認された。

- 1) Inagaki, F., Hayashi, S., Doi, K., Motomura, Y., Izawa, I. and Ogata, S. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **24**, 41-48, (1997)
- 2) Inagaki, F., Yokoyama, T., Doi, K., Izawa, E. and Ogata, S. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **62** (6), 1271-1272, (1998)

Silica-induced protein of extremely thermophilic bacterium, *Thermus* spp.

○Ryoichi Kawatsu, Miki Tahara, Fumio Inagaki, Katsumi Doi, and Seiya Ogata
(Inst. Genet. Resources, G. School, Kyushu Univ.)

【Key Words】 extremely thermophilic bacterium, *Thermus* spp. silica scale, silica-induced protein,

昆虫細胞抽出液を用いた無細胞蛋白質合成系によるポリオーマウィルスVP1シュードキャプシドの発現

村田匡礼・田村泰裕・原 敏夫¹

九州大学大学院生物資源環境科学府・農学研究院¹

ポリオーマウィルスVP1（分子量45 kDa）は、ウィルス粒子を構成する3種類のペプチドの1つである。VP1は五量体からなるキャプソメアを形成し、72個のキャプソメアが会合してシュードキャプシドを構成する。VP1シュードキャプシドは、DNAをpackagingすることができ、carrier proteinとして遺伝子治療への応用が期待されている。

我々はこれまでに昆虫細胞抽出液を用いた糖鎖付加を伴う無細胞蛋白質合成系を構築した。今回、分子量1,500万Da以上にも達する超高分子VP1シュードキャプシドの無細胞蛋白質合成系による翻訳を試みた（Tarui *et al.*, *J. Biosci. Bioeng.*, 90:, 印刷中.）。PCRにて増幅したVP1断片をpUC18に導入後、T7 RNAポリメラーゼを用いてmRNAを合成し、翻訳反応の鋳型とした。翻訳産物の検出は、SDS-PAGE後、ウェスタンブローディングにて行った。その結果、45 kDaに相当する位置にバンドが検出された。現在、得られた翻訳産物のシュードキャプシド構造を検討中である。

日本農芸化学会大会西日本支部会（沖縄） 10月、1999年

D am 2 コンポストから分離された硝酸還元菌の特性と硝酸還元酵素遺伝子の解析
(九大院・農学研究院・遺資研) ○丸山繁美、秋吉直樹、稲垣史生、土居克実、緒方靖哉

【目的】飼料作物には多量のNO₃が含有され、家畜がNO₃中毒を招く危険性が問題になっている。本研究は、サイレージ乳酸菌に強力な硝酸還元能を付与し、NO₃をサイレージ発酵過程で微生物的に低減化することを目的としている。これまで、硝酸還元酵素遺伝子検索のためにコンポストより、優れたNO₃分解能を持つNo.161株を分離した。本菌株は、16S rDNA解析などの結果、*Bacillus licheniformis*と近縁であることが示唆された。今回は、No.161株の硝酸還元に関与する遺伝子群の解析を行った。

【方法・結果】*E. coli*と*B. subtilis*の硝酸還元オペロンの一部である*narH*の塩基配列を基にプライマーを合成し、No.161株の*narH*の一部を増幅した。得られた*narH*部分配列は、*B. subtilis*の*narH*と高い相同性(82%)を示した。さらに、*B. subtilis*の*nar*オペロン(約6.2kb)の塩基配列を基にプライマーを合成し、No.161株の*nar*オペロン全体の増幅を試みたところ、様々な大きさの増幅断片の存在を認めた。そこで、*narH*部分増幅断片をプローブとしてサザンハイブリダイゼーションを行い、ポジティブクローンを検出した。これらの組換えプラスミド中には、*B. subtilis*の*narG*および*narH*と高い相同性を示す挿入断片が存在した。よって、No.161株中には*B. subtilis*と同様な*nar*オペロンが存在することが強く示唆された。これらの近傍の遺伝子の解析を進めている。

日本農芸化学会大会西日本支部会（沖縄） 10月、1999年

D pm 5 Phosphoserine phosphatase 様およびMinD様タンパク質をコードするDNA断片の
*Streptomyces azureus*の形態分化へ及ぼす影響
(九大院・農学研究院・遺資研) ○蒲池泰治、西山孝、酒見博士、土居克実、緒方靖哉

【目的】*S. azureus* BalA1株は、気中菌糸形成能を欠損した**ald**の表現型を示す形質転換株である。BalA1株は、多コピープラスミドベクターに*S. azureus*の2.5kb染色体断片を挿入した組換えプラスミドを有し、本断片中には、2個のORF($\Delta minDSA$, *pspSA*)が確認されている(*FEMS Microbiol. Lett.*, 190, 133-139(2000))。本研究では、放線菌の形態分化に深く関与していると推測される2.5kb染色体DNA断片の機能を解明することを目的としている。

【方法・結果】今回は、多コピーベクターpSAB931を用いたBalA1株と低コピーベクターpRES18KAを用いた形質転換体C-PRESKA株の性状を比較し、2.5kb断片の遺伝子量の形態分化へ及ぼす影響を検討した。両ベクターにはカナマイシン耐性遺伝子が選択マーカーとして共通に存在する。C-PRESKA株はpRES18Kに2.5kb断片を挿入したpRES18KAを*S. azureus* PK100C株に形質転換して作製した。C-PRESKA株は固体培地では、親株であるPK100C株より生育が遅いものの気中菌糸と胞子を形成し、気中菌糸・胞子形成不能なBalA1株とは性質が大きく異なった。これらの結果から、BalA1株の形態分化抑制には2.5kb断片の遺伝子量の増加が影響していると判断した。また、液体培地中では、BalA1株およびC-PRESKA株の増殖は、PK100C株に比べ良好であった。この差異は、両形質転換株ではPK100C株に比べ菌糸の分岐が少なく、ペレットの形成が弱いことによると推察した。

D pm 6 放線菌 *Streptomyces lividans* TK24のヒストン様タンパク質HSIとHSI2

（九大院・農学研究院・遺資研，生物化学*）

○横山英之、土居克実、*木村誠、緒方靖哉

【目的】 細菌のヒストン様タンパク質HUは、DNAの構造維持、複製及び分配に関与していると言われている。演者らは、これまでにHU型ヒストン様タンパク質HSIを *S. lividans* TK24から分離し、その遺伝子 *hup* をクローニングした。また、HSIとは別種のHU型ヒストン様タンパク質HSI2をコードする遺伝子 *hup2* をクローニングしている。本研究は、一般細菌と異なり直鎖状の構造を持ち、形態分化の過程で、多核の菌糸から単核の胞子が生じる放線菌における、ヒストン様タンパク質の機能と性質を明らかにすることを目的とした。

【方法と結果】 *hup* 遺伝子の後半部分とカナマイシン耐性遺伝子 *kan* とを交換した *hup* 破壊株（EY1-EY6）を構築した。得られた *hup* 破壊株EY1は、固体培地上では親株TK24との差異は認められなかった。しかし、液体培地中では、TK24株よりも生育が遅れた。この生育の遅延は、*hup* の再導入により回復した。また、無核細胞形成等の異常は確認できなかった。EY1株から1本鎖DNA結合タンパク質を分離したところ、HSIは完全に喪失しているが、CspAタンパク質の増加が認められた。TK24とEY1株におけるHSI2の発現量の違いを検討するために、現在His-tagged HSI2の抗体を作製中である。

Isolation and Selection of Thermotolerant Lactic acid Bacteria Showing Antimicrobial Activity From Chicken Intestines

Nitisinprasert S¹., Nilphai V.¹, Sukyai P.¹, Bunyeun P¹, Doi K,² & Sonomoto K.³

Department of Biotechnology, Faculty of Agro-Industry, Kasetsart University, 50 Paholyothin Rd., Chatuchak, Bangkok 10900, Thailand (1). Microbial Genetics Division, Institute of Genetic Resources, Kyushu University, 6-10-1 Hozozaki, Higashi-ku, Fukuoka, 812-8581, Japan (2). Laboratory of Microbiology Science and Technology, Division of Bioscience and Biotechnology, Graduate School of Bioscience and Bioenvironment Sciences, Kyushu University, 6-10-1 Hozozaki, Higashi-Ku, Fukuoka 812-8581, Japan (3).

256 Lactic acid bacteria (LAB) strains were isolated from Chicken intestines and screened for the production of antimicrobial activity. Using a target panel of 12 *Escherichia coli*, strain E001 - E012, and 3 *Salmonella sp.*, strain S001 - S003, which were resistant to antibiotics used in animal feed, 20 effective isolates of LAB show bacteriocin – like activity (BLA) against these target strains to varying degrees. Broad spectrum inhibition specific (SIS) were found from 6 h cultivation while the longer cultivation time of 12 and 24 h appeared either loss of BLA or exhibition of inhibition activity against the different target strain. 4 positive strains showing wide SIS were found. Cell free culture fluid adjusted pH to 6 of LAB strain AC5 showed inhibitory effect to 12 target strains except E006, E010 and S001 whereas LAB strain AC16 and AC20 to 13 strains except E009 and S001. The last one, strain AC8, exhibited inhibition activity against 14 target strains except S001. LAB strain AC5, AC16 and AC20 were a heterofermentative and could grow at temperature up to 50° C. They all possessed 4 plasmid bands with the size of 17, 15, 7.7 and 5 kb. However the strain AC8 was a homofermentative LAB and grew well at temperature of 37°C but not at 45 - 50°C. No plasmid DNA was found from this strain. Taxonomic studies of three thermotolerant strains were further carried out by morphological, physiological and biochemical characters. The result showed that LAB strain AC5, AC16 and AC20 belonged to *Lactobacillus fermentum*. However, when analysis on 16sRNA sequence and % mol of G+C content were taken into account, these isolates were classified as *L. reuteri*.

Genetic Analysis of Plasmids in the Silage-making Lactic Acids Bacteria and Application for the Preparation of High Quality Silage.

Katsumi Doi¹⁾, Tomoko Eguchi¹⁾, Mangkorn Rodprapakorn²⁾, Jun Shima³⁾,
Sadahiro Ohmomo³⁾ and Seiya Ogata¹⁾

¹⁾ *Microbial Genetics Division, Institute of Genetic Resources, Faculty of Agriculture,
Graduate School, Kyushu University,*

²⁾ *Department of Biotechnology, Faculty of Agro-Industry, Kasetsart University,
Thailand*

³⁾ *National Institute of Animal Industry, Ministry of Agriculture, Forestry and
Fisheries, Japam*

Phage contamination has resulted in abnormal fermentation in silage. A phage-resistant strain, *Lactobacillus plantarum* NGRI 0101, carried two plasmids, pLKL and pLKS. By curing and retransformation of the plasmids, we clarified that pLKS has phage resistance activity, characterized as no adsorption inhibition. pLKS has 2,025bp and three ORFs. The predicted amino acid sequence of the *orf918* product showed high similarity to those of Rep proteins of *P. halophilus* plasmid pUCL287 and *L. acidophilus* plasmid pLA103. The replication origin was upstream from *orf918*. And, pLKS could use a θ -mode of replication. There was no gene similar to phage resistance genes encoded by known plasmids. The phage resistance of NGRI 0101 may possibly be due to a plasmid-encoded abortive infection.

T. Eguchi, K. Doi, K. Nishiyama, S. Ohmomo and S. Ogata; *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **64**
(4) 751-756 (2000)

B-09

無細胞糖蛋白質合成における糖鎖付加機構

（九大院農・遺資工）○谷 育子 村田 匡礼 原 敏夫

【目的】現在、遺伝子より蛋白質を合成する方策の一つとして無細胞蛋白質合成系が注目されている。しかし、既存の無細胞蛋白質合成系では糖鎖付加反応は期待できない。我々はこれまでに N 型糖鎖付加能を有する昆虫細胞由来の無細胞蛋白質合成系を構築し、N 型糖鎖修飾された糖蛋白質 HIV-1gp120 (g-gp120) の合成に成功している。本研究では本合成系の糖鎖付加機構の解析した。

【方法と結果】昆虫細胞由来の無細胞蛋白質合成系は既報¹⁾に準じた。分泌シグナル配列を保存した gp120wt mRNA 及びシグナル配列を除去した gp120Δs mRNA を鋳型とした合成反応の結果、gp120wt を鋳型とした時のみ糖鎖付加が確認した。また g-gp120 はプロテアーゼ処理に耐性を示したことから、本合成系で合成された g-gp120 は生細胞と同様に分泌シグナル配列に依存してミクロソーム内に移行後、糖鎖が付加されると推察した。現在、本合成系に存在すると推察される小胞体、ゴルジ体の確認及び合成された蛋白質の局在について、シヨ糖密度勾配遠心法を用いて検討中である。

¹⁾ Tarui *et al.* (2000) *J. Biosci. Bioeng.* 90, (5), 印刷中.

B-10

無細胞蛋白質合成系によるポリオーマウイルス VP1 シュードキャプシドの生産

（九大院農・遺資工）○村田 匡礼、田村 泰裕、原 敏夫

【目的】72個のペントマーから形成されるポリオーマウイルス VP1 シュードキャプシドは、セルフアセンブルして外来 DNA をパッケージングする事ができるため、遺伝子治療への応用が期待されている。我々はこれまでに昆虫細胞抽出液を用いた糖鎖付加能を有する無細胞蛋白質合成系を構築した。今回、本反応系を用いてポリオーマウイルス VP1 シュードキャプシドの生産を試みた。

【方法と結果】PCR にて増幅した VP1 断片を pUC18 に導入後、T7 RNA ポリメラーゼを用いて mRNA を合成し、翻訳反応の鋳型とした。翻訳産物の検出は、SDS-PAGE 後、モノクローナル抗体を用いたウエスタンブロッティングにて行った。その結果、45 kDa の VP1 が検出された。また合成 VP1 を含む反応液を 20%スクロースクッションに供した結果、Sf21 細胞及びカイコ個体で発現した VP1 シュードキャプシドと同じペレット画分から合成された VP1 の 12%が回収された。このことから反応液中で VP1 シュードキャプシドが形成されていることが示唆された。

B-29

ポリオーマウイルス VP1 シュードキャプシドのカイコによる生産
(九大院農・遺資工) ○田村 泰裕、村田 匡礼、原 敏夫

(目的) 我々はこれまでに昆虫培養細胞抽出液を用いた無細胞蛋白質合成系を構築した。本合成系の有する機能解明の一環として、生物個体で発現した蛋白質の比較のため、ポリオーマウイルスの主要コート蛋白質である VP1 のカイコでの発現を行った。VP1 は自己会合によりシュードキャプシドを形成し、外来 DNA のパッケージング能を持つことから遺伝子治療用キャリアー蛋白質として期待されている。今回、カイコを用いたポリオーマウイルス VP1 シュードキャプシドの発現とその蛋白質的性質について検討した。

(方法と結果) BmNPV DNA と共に VP1 遺伝子を導入したトランスファーベクター pBM030 をセルフェクチン法を用いて細胞内に導入し、細胞内における相同組換えにより組換えウイルスを作成した。ブランクアッセイ法にて純化した本ウイルスを 5 齢のカイコに注射し、感染後 4 日目の体液を回収した。VP1 の発現はモノクローナル抗体を用いたウエスタンブロットティングにて検出した。遠心上清を硫酸塩析した後、20%スクロースクッション、塩化セシウム密度勾配遠心を用いて VP1 を分離・精製した。精製 VP1 標品の N 末端アミノ酸配列は昆虫細胞 (Sf21) で発現した VP1 と一致し、さらに電子顕微鏡観察によって VP1 の自己会合も確認した。現在、外来 DNA キャリアー機能について検討中である。

1Y1p24

Enterococcus faecalis K-4 株のバクテリオシン生産特性

○岩武敦司, 江口智子, 土居克実, 大桃定洋*, 緒方靖哉
(九大院・農院・微生物遺伝子工学, *農林水産省)

【目的】タイのサイレージより分離された *E. faecalis* K-4 株は、保有するプラスミド pEK4S 上にコードされるバクテリオシン, enterocin SE-K4 (SE-K4 と略) を生産する。本研究では、SE-K4 の生産性向上を目的としてその生産特性を検討した。

【方法と結果】K-4 株の生育とバクテリオシン生産性との関連について検討し、最適生育温度 (37°C) よりも高温域 (43-45°C) で SE-K4 の活性が上昇することを明らかにした。また、各種乳酸菌培地に Tween 80 などの非イオン性界面活性剤を添加することで、菌体の生育に影響を及ぼすことなく、培養上清の SE-K4 の活性が上昇することを見出した。培養後の菌体を界面活性剤溶液で洗浄しても、活性の上昇は認められなかった。これらのことから、Tween 80 などによる SE-K4 の活性の上昇には、培養過程を経ることが必要であると示唆された。その生産性向上の機作が、プラスミド機能への直接的な作用、もしくは膜タンパク質などへの間接的な作用によるのかを検討している。

1K1p17

ポリオーマウィルス VP1 シュードキャプシドの無細胞蛋白質合成系による合成
○村田匡礼、田村泰裕、原敏夫（九大院農・遺資工）

【目的】72 個のペントマーから形成されるポリオーマウィルス VP1 シュードキャプシドは、セルフアッセンブルして外来 DNA をパッケージングする事ができるため、遺伝子治療への応用が期待されている。我々はこれまでに昆虫細胞抽出液を用いた糖鎖付加能を有する無細胞蛋白質合成系を構築した。今回、本反応系を用いてポリオーマウィルス VP1 シュードキャプシドの合成を試みた。

【方法と結果】PCR にて増幅した VP1 断片を pUC18 にサブクローニング後、T7 RNA ポリメラーゼを用いて mRNA を合成し、翻訳反応の鋳型とした。翻訳産物の検出は、SDS-PAGE 後、モノクローナル抗体を用いたウエスタンブロッティングにて行った。その結果、45 kDa の VP1 が検出された。またその収量は約 80 μg/ml であった。さらに、20%スクロースクッションによる合成 VP1 の精製を行った。その結果、Sf21 細胞及びカイコ個体で発現した VP1 シュードキャプシドと同じベレット画分から合成された VP1 が確認され、シュードキャプシドを形成していることが示唆された。現在、電子顕微鏡による VP1 シュードキャプシド構造の確認を検討中である。

2Y1a12 *Streptomyces coelicolor* A3(2)に及ぼすバシトラシンの生育促進作用
○木久山礼憲, Adel K. Okba, 土居克実, 木村誠*, 緒方靖哉
(九大院・農学研究院・微生物遺伝子工学, *九大院・農学研究院・生物化学)

【目的】抗生物質バシトラシン (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 *S. azureus* に対し、固体培地上での気菌糸形成、胞子形成を早期に誘導し、液体培養においては液内菌糸量の増加、ペレット形成の抑制に作用する¹⁾。また、BC添加によって *S. azureus* におけるポック形成の抑制も認められた。本研究では、上記に類似したBCの作用が *Streptomyces coelicolor* A3(2)においても認められたので報告する。

【方法及び結果】BC添加培地で培養した *S. azureus* 菌体からBCによって誘導された膜蛋白質を分離し、N末端配列(-VFAYESLSKRFPFR-)を決定した。本配列をBLASTで検索したところ、*S. coelicolor* A3(2)の probable ABC-type transport system(pir:T36062)のN末端13アミノ酸残基と76%の相同性が認められた。この結果から、*S. coelicolor* A3(2)においても同様にBCに対応するメカニズムの存在が示唆された。そこで、Bennett液体培地にBCを添加し、*S. coelicolor* A3(2)への影響を検討した。その結果、終濃度40 μ g/mlのBCを添加すると、*S. azureus*と同様に誘導期が約24時間延長するものの、最終的な菌体湿重量はBC無添加の場合と比較して、約1.7倍に増加した。また、BC無添加の場合に比べて、ペレットが小サイズ化していた。現在、BCが及ぼす形態変化の詳細な解析を行なうと共に、BCによって誘導される膜蛋白質の解析を進めている。

¹⁾ Okba et al. *J. Ferment. Bioeng.*, **86**: 28 (1998).

2Y1a13 MinD様およびPhosphoserine phosphatase様タンパク質をコードするDNA断片の *Streptomyces azureus* の形態分化へ及ぼす影響 (その2)
○蒲池泰治, 西山孝, 土居克実, 緒方靖哉 (九大院・農学研究院・微生物遺伝子工学)

【目的】*S. azureus* BalA1株は、気中菌糸形成能を欠損した bald の表現型を示す形質転換株である。BalA1株は、多コピーベクターに *S. azureus* の2.5kb染色体断片を挿入した組換えプラスミドを有し、本断片中には、2個のORF (Δ minDSA, pspSA)が確認されている¹⁾。本研究では、放線菌の形態分化に深く関与していると推測される2.5kb染色体DNA断片の機能を解明することを目的としている。

【方法・結果】多コピーベクターpMCP5で作製したpSAB931を用いたBalA1株と低コピーベクターpRES18Kで作製したpRES18KAを用いたC-PRESKA株の性状を比較し、2.5kb断片の遺伝子量の形態分化へ及ぼす影響を検討した。両ベクターにはカナマイシン耐性遺伝子が選択マーカーとして共通に存在する。親株はPK100C株を使用した。

C-PRESKA株は固体培地では、親株であるPK100C株より胞子成熟が遅れたが、気中菌糸と胞子を形成し、気中菌糸形成不能なBalA1株とは性質が異なった。これらの結果から、BalA1株の形態分化抑制には2.5kb断片の遺伝子量の増加が影響していると推測した。また、液体培地中では、BalA1株およびC-PRESKA株の増殖は、PK100C株に比べ良好であった。この差異は、両形質転換株は、PK100株に比べ、菌糸の分岐や絡みが少なく、ペレットの形成が非常に少なくなるためであると考えられた。また、カナマイシンを添加した液体培地中では、C-PRESKA株のlag timeは、PK100C株にベクターpRES18Kのみを導入した菌株に比べ短く、両者間で大きな差が見られた。この結果は、2.5kb断片の遺伝子がC-PRESKA株のカナマイシン耐性にも関与していることを示唆している。

¹⁾ *FEMS Microbiol. Lett.*, **190**, 133-139(2000)

3Y2p11

高度好熱菌 *Thermus* sp. TMY 株由来シリカ誘導性蛋白質 Sip

○田原美紀、川津領一、稲垣史生、木村誠*、土居克実、緒方靖哉

(九大院・農院・微生物遺伝子工学、*九大院・農院・生物化学)

【目的】本研究グループは、これまでに、地熱水環境下におけるシリカ鉱物形成機構について検討を行ってきた。その結果、熱水中に生息する細菌が溶存シリカの鉱物化に関与することを明らかにしている¹⁾。また、*in vitro*系で高度好熱菌 *Thermus* sp. TMY 株を過飽和のシリカが溶存する培地で培養すると、過飽和のポリマーシリカの重合を促進し、非結晶質のシリカ沈殿物が短時間に形成することを認めた²⁾。今回、非結晶質シリカの沈殿を生成する際に誘導産生される膜蛋白質 Sip について、カラムクロマトグラフィーによる精製と構造解析を試みたので報告する。

【方法及び結果】メタ珪酸ナトリウムでシリカ濃度を 600 ppm に調整した培地で培養した菌体を用い、超音波破砕した細胞粗抽出液を超遠心分離 (356,000×g, 2 h) し、膜蛋白質を取得した。本成分を 0.1% (w/v) Tween 20 で可溶化後、SP Sepharose Fast Flow カラムクロマトグラフィー、Q Sepharose Fast Flow カラムクロマトグラフィーによる精製を行うことで、電気泳動的に均一な Sip 蛋白質が得られた。本蛋白質の N 末端アミノ酸配列の決定を行ったがブロックされており、解析が不能であった。よって、V8 プロテアーゼ消化したペプチド断片を HPLC で分離・精製し、内部アミノ酸配列を解析し、2 個の部分アミノ酸配列を得た。これらの配列を BLAST で検索した結果、既知配列との相同性は見いだせなかったことから、Sip は、新規蛋白質の可能性が示唆された。内部アミノ酸配列を基に PCR プライマーを作成し伸長反応を行ったところ、約 500 bp の特異的な断片が認められたので、現在の塩基配列を基に Sip をコードする遺伝子のクローニングを進めている。

1) F. Inagaki et al., *FEMS Microbiol. Ecol.*, **24**, 41-48 (1997)

2) F. Inagaki et al., *Biosci. Biotech. Biochem.*, **62**, 1271-1272 (1998)

2Y4a13

Enterococcus faecalis K-4 株のバクテリオシン enterocin SE-K4 の生合成及び免疫に関与する遺伝子

○廣田由紀子、江口智子、土居克実、大桃定洋*、緒方靖哉

(九大院・農院・微生物遺伝子工学、*農林水産省)

【目的】タイのサイレージより分離された *E. faecalis* K-4 株は、耐熱性の抗菌ペプチドであるバクテリオシン、enterocin SE-K4 を生産する。本研究は、enterocin SE-K4 の構造・機能を解明することを目的としている。本大会では、生合成および免疫に関与する遺伝子の同定を行った。

【方法及び結果】enterocin SE-K4 の構造遺伝子は、*E. faecalis* K-4 株の保有するプラスミド pEK4S (約 60kb) 上の *orf6* (231bp) にコードされている。*orf6* の下流に *E. faecium* のバクテリオシン、enterocin P の免疫遺伝子と高い相同性を示す *orf9* (270bp) を検出した。この推定アミノ酸配列は、疎水領域と親水領域を交互に持つ構造を取っており、細胞膜に存在するタンパク質である可能性が高いことから、*orf9* が免疫に関与していると推察された。また、*orf6* の上流にプロモーター、*orf9* の下流にターミネーターと推定される配列を検出した。そこで、*E. faecalis* K-4 株より Total RNA を抽出し、*orf6* から *orf9* までの断片をプローブとしたノーザンハイブリダイゼーションを行った結果、約 1.5kb の位置にシグナルが認められた。以上のことより、enterocin SE-K4 の転写は、enterocin SE-K4 の構造遺伝子である *orf6* から、免疫遺伝子である *orf9* までのユニットとして行われていると推察された。

3Y4p5

放線菌*Streptomyces lividans* TK24のヒストン様タンパク質
（九大院・農学研究院・微生物遺伝子工学，生物化学*）
○横山英之、土居克実、*木村誠、緒方靖哉

【目的】 細菌のヒストン様タンパク質HUは、DNAの構造維持、複製及び分配に関与していると言われている。演者らは、これまでにHU型ヒストン様タンパク質HSIを*S. lividans* TK24から分離し、その遺伝子*hup*をクローニングした。また、HSIとは別種のHU型ヒストン様タンパク質HSI2をコードする遺伝子*hup2*をクローニングしている。本研究は、一般の細菌と異なり直鎖状の構造を持ち、また、形態分化の過程で多核の菌糸から単核の胞子が生じる放線菌における、ヒストン様タンパク質の機能と性質を明らかにすることを目的とした。

【方法と結果】 *hup*遺伝子の後半部分とカナマイシン耐性遺伝子*kan*とを交換した*hup*破壊株（EY1-EY6）を構築した。得られた*hup*破壊株EY1は、固体培地上では親株TK24との差異は認められなかった。しかし、液体培地中では、TK24株よりも生育が遅れた。この生育の遅延は、*hup*の再導入により回復した。また、無核細胞形成等の異常は確認できなかった。EY1株から1本鎖DNA結合タンパク質を分離したところ、HSIは完全に喪失しているが、CspAタンパク質の増加が認められた。抗His-tagged HSI2抗体を用いたwestern blottingにより、EY1株において、HSI2の増加が認められた。このことから、HSI2の増加が、HSIの欠失を補っていることが示唆された。

《日本農芸化学会功績賞》

新規微生物現象の解明と応用に関する研究

九州大学大学院農学研究院遺伝子資源工学部門 緒方靖哉

発酵などの産業にとって、生産に支障をきたす微生物現象の原因究明とその対策は危機管理上の最重要課題である。しかも、これらの微生物現象には、新規のあるいは特異性のある有用な微生物機能も見いだされる。筆者らは、以下に記すように、現実に生産異常をもたらした未解明微生物現象を究明し、得られた成果を、生産への対応策のみならず基礎ならびに応用分野の研究に活用した。

1. ファージ汚染と防除対策に関する研究

筆者が40年近く研究の対象にしている細菌ウイルス（ファージ）との初めてのかかわりは、卒論の学生として入室した恩師本江元吉先生の研究室であった。時に、わが国は高度経済成長期で、発酵産業も他産業と同様、工場の拡張につぐ拡張が続き、新しい発酵産業が加わったことなども要因となり、さまざまな発酵生産プロセスでファージ汚染が次々と発生していた。種々の企業のご協力を得て、ファージ汚染経過や発生機構を明らかにし、多数の新知見を提示して、ファージ汚染とその防除に関する研究成果を、6編の国内外の著書および総説にまとめることができた。今日、多くの発酵工場では予防対策を中心とするファージ汚染対策が採られ、深刻な被害は回避できるようになったことは、これらの研究成果が役に立っていると多少とも自負している。

一方、原料の殺菌が行えない発酵あるいは開放系の発酵ではファージ汚染の防止は難しく、有効な汚染対策を目指した研究が今日も活発に行われている。筆者らは、活性汚泥の浄化機能低下と西南暖地型サイレージの発酵品質低下の要因に、ファージ感染による優占菌株の死滅と交代がかかわっていることを発見して、汚染状況や汚染機構を明らかにした。特にサイレージ発酵では、ファージ汚染に続く雑菌・腐敗菌の繁殖によって著しいサイレージの品質低下が起こる。これを抑制する機能性遺伝子をファージ耐性プラスミドおよびバクテリオシン生産性プラスミドに見だし、これらの遺伝子の構造・機能や新規ファージ耐性機構などを明らかにした。現在、これらの遺伝子の応用開発を

進めている。

この間、多種多様なファージやバクテリオシン活性をもつファージ尾部粒子の発見、分離した溶原性ファージやファージ耐性プラスミドのベクター化、ファージのコードする溶菌酵素 (endolysin) の応用などのファージとプラスミド機能の利用開発を図った。

2. 溶菌現象、溶菌酵素、および細胞表層に関する研究

糖度を高くして培養する高濃度仕込みや生理食塩水中で、溶菌が起こる現象を *Clostridium* 属細菌で追究した。まず、0.2~0.5 M のショ糖や NaCl などが存在すると、細胞壁が自己溶解しながらプロトプラスト化することを見いだした。溶菌経過を詳細に解析して、溶菌に及ぼす自己融解酵素 autolysin の作用機作を明らかにし、また本溶菌はやや過剰の2価金属イオンの添加で制御できることを示した。これらの成果は、細胞膜の分離と化学組成の決定に、またプロトプラスト形質転換法や DNA 分離法に活用でき、放線菌などの遺伝子工学にも応用されている。また、本成果は、ブタノール発酵に必須な鉄イオンがその生成時期に対応して特異的にペプチドグリカン層に多量蓄積するなど細胞表層の機能に関する重要な知見の発見につながった。ついで、ファージの産生に伴う細胞溶解を、ファージ endolysin の性状と生成過程、宿主 autolysin のかかわり、さらに細胞壁の組成と構造などから解析し、細胞内部からの溶菌現象に関して多くの成果を得た。

3. 放線菌の形態分化異常に関する研究

(1) 自然誘発性 pock 形成現象

Streptomyces 属放線菌には孢子の欠失した菌叢を生じる進行性の異常現象が普遍的に見られる。その発生は、孢子をスターターにしている抗生物質生産現場にとって培養や菌株保存に支障をきたすことから、原因をチオストレプトン生産菌 *S. azureus* や *S. laurentii* などを用いて追究した。本現象は、雌雄異株間で接合性プラスミドの転移に伴って生じる“pock”と呼ばれる類似の接合致死現象と共時性発見になったが、単

**Characterization of a plasmid pLKS conferring phage resistance to silage-making
*Lactobacillus plantarum***

Tomoko Eguchi, Katsumi Doi, Sadahiro Ohmomo*, Seiya Ogata (Institute of Genetic Resources, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Hakozaki, Fukuoka 812-8581, *National Institute of Animal Industry, Ibaraki 305-0901, Japan)

The presence of bacteriophage in silage-making lactobacilli is a major problem for silage fermentation. We isolated the phage-resistant strain, *L. plantarum* NGRI 0101 from silage. The strain carried two plasmids, pLKL (6.8kb) and pKLS (2.0kb). By curing and retransformation, it was clarified that pLKS had the phage resistant activity. DNA analysis of pLKS showed 2051bp in size and three ORFs, *orf 123*, *orf 132*, and *orf 918*. There is no gene similar to the phage resistant genes previously reported. Predicted amino acid sequence of *orf 918* showed high similarity to that of Rep A of *Pediococcus halophilus* plasmid pUCL287. The replication origin (*ori*) was found upstream from *orf 918*. We suggest that phage resistance of *L. plantarum* NGRI 0101 participates in the antagonistic relation between the Rep or *ori* for pLKS and phage replication.

(注：要旨集製作遅延のため本号に掲載いたしました)

III. センターの活動状況

1. 教育活動

【家蚕遺伝子開発分野】

大学院生物資源環境科学研究科（博士課程）

上野 由宜 カイコの体液キモトリプシンインヒビターの生理機能に関する研究

李 斌 カイコの腎臓形卵の分子生物学的研究
(李 斌 氏は中国西南農業大学からの短期交換留学生)

大学院生物資源環境科学研究科（修士課程）

趙 萍 カイコの体液キモトリプシンインヒビターに関する遺伝学的研究

関 力 カイコの体液キモトリプシンインヒビターの生理機能に関する研究

外国人研究生

張 平 波 カイコの胚子発生過程におけるタンパク質の動的変化に関する研究

訪問教授・研究員

代 方 銀 カイコの遺伝子資源の特性調査研究
(中国、西南農業大学講師)

姜 永煌 カイコ消化液35kプロテアーゼに関する研究
(中国、浙江大学 講師)

呂 継 業 柞蚕の限性品種育成に関する研究
(中国、吉林省蚕業科学研究所副所長)

外国人来訪者

向 仲 懐 (中国、西南農業大学学長)

宋 方 州 (中国、西南農業大学蚕桑絲綢学院院長)

魯 成 (中国、西南農業大学教授)

【植物遺伝子開発分野】

大学院生物資源環境科学研究科（修士課程）

Pa Pa Aung ミャンマーイネの遺伝子資源学的研究

小松 由実 イネ種子貯蔵タンパク質グルテリンの細胞内輸送・
蓄積に関するグロブリンの同定

佐藤 美緒 イネ胚乳中に認められた2種のプロテイン
ジスルフィドイソメラーゼの単離と組織局在性の解明

波田江裕子 イネのアミロペクチン枝作り酵素BE II aに関する
変異体の遺伝・育種学的研究

大学院生物資源環境科学研究科（博士課程）

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

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

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

Jahan MD Sarwar バングラディッシュイネの遺伝子資源学的研究

研究生

牛島智一 イネ種子貯蔵タンパク質プロラミンの生合性に関する
遺伝学的研究

外国人研究生

Jahan MD Sarwar バングラディッシュイネの遺伝子資源学的研究

【微生物遺伝子開発分野】

大学院生物資源環境科学研究科（修士課程）

上田 芳久 ポリグルタミン酸の構造と機能

片山 聡 エンベロープ糖蛋白質HIV-1gp120の生産とその利用

蒲池 泰治 *Streptomyces azureus* の形態形成遺伝子*minDSA*の改変

川津 領一 高度好熱菌*Thermus* sp. TMY の分類と特性

谷 育子 生体外蛋白質合成系の高効率化

丸山 繁美 硝酸還元酵素遺伝子のサイレージ乳酸菌への導入

- 岩武 敦司 乳酸菌プラスミドpEK4Sにおけるenterocin SE-K4の
温度依存性産生機構
- 大山 由紀子 *Streptomyces azureus* のDNA転移に関与する遺伝子の発現と
制御機構
- 木久山 礼憲 *Streptomyces azureus* のバシトラシン誘導性膜タンパク質の
構造と機能
- 田原 美紀 高度好熱菌*Thermus* sp. TMY のシリカ誘導性膜タンパク質
の構造と機能
- 田村 泰裕 超生体高分子VP1の*in vitro*生産系の開発と応用
- 西武 小百合 *Streptomyces laurentii* の接合性プラスミドpSLSとpSLLの
構造解析
- 廣田 由紀子 乳酸菌プラスミドpEK4Sのenterocin SE-K4の生合成と免疫
に関する遺伝子の解析

大学院生物資源環境科学研究科（博士課程）

- 樽井 寛 昆虫機能を利用した生体外蛋白質合成系の構築
- 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
- 江口 智子 サイレージ乳酸菌の機能性プラスミドに関する研究
- 酒見 博士 *Streptomyces laurentii*における接合性プラスミドの*kil-kor*
システムに関する研究
- 村田 匡礼 生体外蛋白質合成系の高効率化

山田 修司

Streptomyces azureus のpock形成に関わる不完全ファージ
遺伝子の作用機構

科学技術庁内地留学研究員

小林 美穂

乳酸菌プラスミドの複製機構の解明とベクター化
(農水省 畜産試験場 研究員)

外国人訪問研究員

Gomaah El-Fadly

放線菌の形態分化に関与する遺伝子の機能解析
(エジプト タンタ大学教授)

Onanong Prinsraka

放線菌ファージの分子生物学的分類とベクター化
(Royal Golden Jubilee program 奨学生
チュラロンコン大学理学部 博士課程)

2. 科学研究費・共同、受託研究等

【家蚕遺伝子開発分野】

基盤研究 (A) 研究代表 藤井 博、分担 伴野 豊

「カイコキモトリブシンインヒビターの生理機能に関する研究」

基盤研究 (C) 研究代表 伴野 豊、分担 藤井 博

「家蚕遺伝子資源の安定的維持を目指した日本・中華人民共和国における保存系統の
特性調査」

農林水産省受託研究

「カイコゲノム解析とその利用法の開発」

【植物遺伝子開発分野】

基盤研究 (A) 研究代表 佐藤 光、分担 熊丸敏博

「低プロラミン米の育種」

特定領域研究 (B) (2) 研究代表 佐藤 光、分担 熊丸敏博

「イネにおけるプロテインボディへの輸送・蓄積を制御する遺伝的メカニズム」

生研機構受託研究 研究代表 佐藤 光、分担 熊丸敏博

「イネ種子胚乳貯蔵成分に関する遺伝子新素材の開発と特性評価」

農林水産省受託研究

「イネ・ゲノムの有用遺伝子の単離及び機能解明と利用技術の開発」

農林水産省受託研究

「遺伝子組換え及びクローン技術による画期的な動植物の開発」

秋田県立大学 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」

【微生物遺伝子開発分野】

基盤研究 (B) 研究代表 緒方靖哉

「好熱菌のシリカ誘導蛋白質の特性とシリカ鉱物化機構」

基盤研究 (A) 研究分担 緒方靖哉

「シリカ・微生物を用いた地球表層水中のアルミニウムの制御に関する研究」

日本学術振興会特別研究員-PD 費 横山英之

「放線菌 DNA の構造維持、複製および分配におけるヒストン様タンパク質の機能解析」

3. 講演会・セミナー・講習会

【微生物遺伝子開発分野】

2000年7月17日

Dr. Hans-W. Ackermann (カナダ・Laval大学医学部 教授)

“The World of Bacterial Viruses”

4. 海外渡航

【家蚕遺伝子開発分野】

藤井 博

中華人民共和国 (浙江大学)

2000年6月18日～2000年6月23日

浙江大学招聘

「学術講演並びに研究交流」

中華人民共和国 (西南農業大学)

2000年12月6日～2000年12月10日

文部省科学研究費補助金 基盤研究 (C)

「家蚕遺伝子資源の安定的維持を目指した日本・中華人民共和国における保存系統の特性調査」

伴野 豊

中華人民共和国 (西南農業大学)

2000年9月15日～2000年9月22日

文部省科学研究費補助金 基盤研究 (C)

「家蚕遺伝子資源の安定的維持を目指した日本・中華人民共和国における保存系統の特性調査」

【植物遺伝子開発分野】

佐藤 光

フィリピン（国際イネ研究所）
2000年10月22日～10月27日
国際イネ遺伝学シンポジウム出席

熊丸敏博

フィリピン（国際イネ研究所）
2000年10月22日～10月27日
国際イネ遺伝学シンポジウム出席

【微生物遺伝子開発分野】

原 敏夫

連合王国、ドイツ、スイス、フランス
2000年6月29日～8月28日
「生物機能を利用する遺伝子自動翻訳装置の開発に関する研究」
(文部省 在外研究員費)

土居 克実

タイ（カセサート大学、King Mongkuts Institute of Technology
Ladkrabang (KMITL)）
「好熱性乳酸菌からの新規バクテリオシンの分離と産業利用」
(日本学術振興会 JSPS-NRCT 拠点大学プロジェクト)

外国人来訪者

Hans-W. Ackermann 教授（カナダ ラバール大学医学部）
2000年7月13日～7月20日
細菌ウイルスの分離・同定についての研究討議

Surina Chavanich 助教授 (タイ国 チュラロンコン大学理学部)

2000年9月10日～9月20日

放線菌遺伝子資源の多様性の研究討議

Amaret Bhumiratana 教授 (タイ国 マヒドール大学理学部 学部長)

2000年12月5日

5. 学会賞受賞等

2001年度 日本農芸化学会功績賞 緒方 靖哉

「新規微生物現象の解明と応用に関する研究」

6. 学術会議の開催・運営

【微生物遺伝子開発分野】

2000年度 日本放線菌学会大会

2000年7月13日～14日 福岡リーセントホテル

一般講演19題、ポスター講演32題、受賞講演2題

特別講演2題、シンポジウム4題 参加者数約200名

大会長：緒方 靖哉

事務局長：土居 克実

組織委員・実行委員：横山 英之、西田 壽子 他

7. センター運営委員会

1. 日 時 平成12年5月30日 (火曜日) 午後1時～

2. 場 所 農学部小会議室

3. 議 題

1) カイコ小委員会の設置について

2) その他

IV. 遺伝子資源系統の保存・管理

遺伝子資源系統の分類・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、染色体構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 $w-3^{oe}$ 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()内に記号で記入し、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×I90, 1985年)} はカネボウから春月系交雑種に生じた*l-li*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I90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)

Chavancy G. 国際養蚕委員会 (フランス)

b40

b41

b50

向 仲 懐 西南農業大学 (中国)

w15

n19

河本 夏夫 蚕糸・昆虫農業技術研究所

o75

中垣雅雄 信州大学繊維学部

b40

b41

b50

022

xa52

古沢 壽治 京都工芸繊維大学繊維学部

130

横山 岳 東京農工大学農学部

d01

d05

d07

o26

w05

黄川田隆洋 蚕糸・昆虫農業技術研究所

n06

n21

t50

小林 正彦 東京大学大学院農学生命科学研究科

k151

n92

t60

u01

u02

u04

u05

u10

u11

u21

u90

w13

w30

鳶 洪 九州大学比較社会文化研究科

5 齡幼虫

大沼昭夫 蚕業技術研究所

i50

土田 耕三 感染症研究所

F50

一田昌利 京都工芸繊維大学繊維学部

r03

w30
d06
l06
c14
k42
o55
f03
e80
d18
f07
i01
f34
k04
o01
r50
n18
p02
w13
g06
a45
d16
m401
l08
m41
f24
b602
m60
xa502

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	4,477 系統
EM系統	胚乳形質に関する突然変異系統	1,392 系統
計		11,708 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3年間でも、パキスタン、韓国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
2000	260	0	0	6-392	1-180

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、*Enterococcus*属、*Lactococcus*属、*Pseudomonas*属、*Thermus*属および大腸菌 47種97株
- (B) 分離株 *Bacillus*属、*Enterococcus*属、*Lactobacillus*属、*Lactococcus*属、*Pediococcus*属、*Pseudomonas*属、*Enterococcus*属及び*Thermus*属 21種821株
- (C) 変異株 *Bacillus*属、*Enterococcus*属、*Lactobacillus*属および*Thermus*属 15種39株

II. 放線菌

- (A) 基準株 *Micromonospora*属、*Nocardia*属、*Rodococcus*属、*Streptomyces*属
および*Streptoverticillium*属 153種170株
- (B) 分離株 *Streptomyces*属 5種5株
- (C) 変異株 *Streptomyces*属 10種229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 120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
96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 23種類
- (B) 分離ファージ 乳酸菌および放線菌系統 121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 48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。

(導入)

理化学研究所 微生物系統保存施設

Bacillus atropheus JCM1465

Bacillus licheniformis JCM 2505

Bacillus megaterium JCM 2506

Bacillus pumilus JCM 2508

Bacillus sphaericus JCM 2502

Paenibacillus polymyxa JCM 2507

発酵研究所

Bacillus brevis IFO 3331

Enterococcus faecalis IFO 12964

Enterococcus faecium IFO 13712

Staphylococcus aureus IFO 15055

農林水産省 食品総合研究所

Escherichia coli MAFF 911145

タイ国 科学技術研究所 (TISTR)

Escherichia coli TISTR 527

Lactobacillus plantarum TISTR 541

Leuconostoc mesenteroides TISTR 473

Pediococcus acidilactici TISTR 952

Salmonella typhimurium TISTR 292

Professor Dr. Hugh Morgan Waikato University

Thermus sp. Fiji3

V. センター内規

九州大学大学院農学研究院附属遺伝子資源研究センター内規

(趣旨)

第1条 この規程は、九州大学大学院農学研究院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2条 センターは、遺伝子資源の保存、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3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4条 センターに長（以下、「センター長」という。）を置き、農学研究院の専任の教授をもって充てる。センター長は、センターの管理及び運営を総括する。

- 2 センター長は、次の各号に掲げる事項に該当する場合に選考する。
 - 一 センター長の任期が満了するとき。
 - 二 センター長が辞任を申し出て、研究院教授会の承認を得たとき。
 - 三 センター長が欠員となったとき。
- 3 センター長の任期は、4月1日から翌々年の3月31日までの2年とし、再任を妨げない。ただし、引き続き二期を超えて在任することはできない。
- 4 第2項第二号及び第三号の場合における後任者の任期は、前項本文の規定にかかわらず、前任者の在任期間とする。ただし、この残任期間が1年以上の場合は、これを一期とみなす。
- 5 センター長の選考は、研究院教授会において行い、有効得票の過半数のかくとかによりセンター長候補者を決定する。

(運営委員会)

第5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、遺伝子資源開発研究センター運営委員会（以下「運営委員会」という。）を置く。

第6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 センターに勤務を命じられた農学研究院の専任の教官のうちから選ばれた者3人
 - 二 各部門（遺伝子資源工学部門を除く。）の専任の教授及び助教授のうちから選ばれた者各1人
 - 三 農学部附属農場及び演習林に勤務を命じられた農学研究院の専任の教授及び助教授のうちから選ばれた者1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1人
 - 五 遺伝子資源工学部門（センターに勤務を命じられた農学研究院の専任の教官を除く。）の専任の教授及び助教授のうちから選ばれた者各1人
- 2 委員の任期は、2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、研究院長が委嘱する。

第7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8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9条 この内規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12年4月1日から施行する。
- 2 この規程施行後、最初に任命されるセンター長は、この規程に基づき選考された者とみなし、その任期は第4条第3項の規程にかかわらず、平成13年3月

31日までとする。

- 3 農学部附属遺伝子資源開発研究センター規程（平成9年2月12日施行）は廃止する。

附則

この内規は、平成12年11月8日から施行する。

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

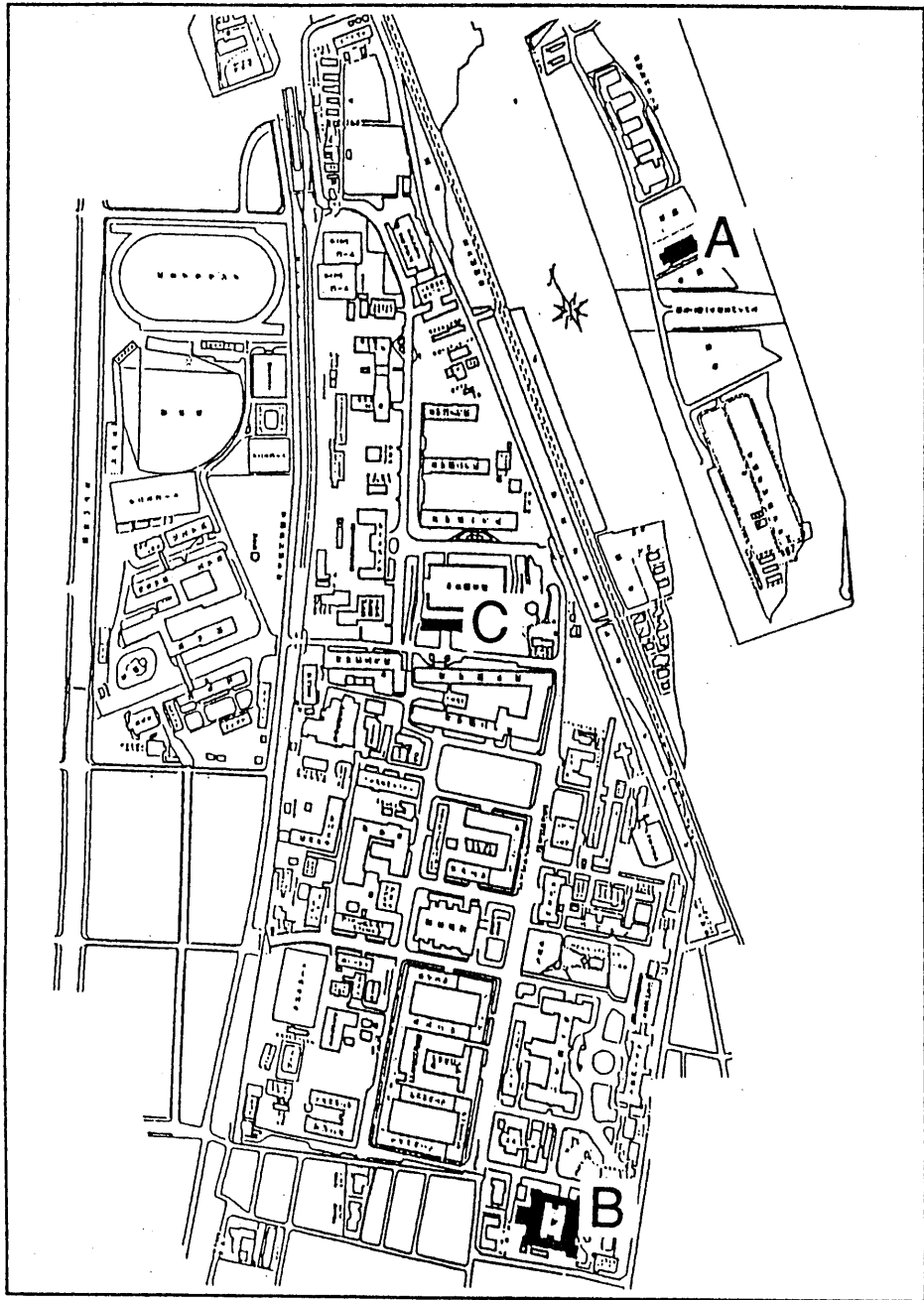
- d) Genome analysis of the useful genes in rice
- e) Isozyme variation in rice, barley and their relatives

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

九州大学農学研究院附属遺伝子資源開発研究センター年報第4号を発刊いたします。

平成12年4月1日より、九州大学農学部は大学院重点化により、教官所属組織として農学研究院、大学院教育組織として生物資源環境科学府が設置されました。これに伴い、遺伝子資源開発研究センターは農学部附属施設から農学研究院附属施設へと配置換えとなりました。このような組織換えは、外部の方にも学生に説明するのにも、最初は要領を得ないことが多々ありました。

しかしながら、国立大学の独立行政法人化や少子化に加え、大学移転問題など、九州大学のおかれている現状や抱えている様々な課題を前にして、組織の改編は新たな活力や駆動力になるものだと考えられます。大学院重点化によって、本センターが更に研究・教育そして社会に貢献する使命も要望も増すものだと考え、名称・所属の変更でなく、更なる中身の充実に勤めて行くべく、センター構成員一同、身を引き締め、期待に胸を躍らせて邁進していきたいと存じます。

今後とも本センターに益々のご支援を賜り、また、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 4 号
平成13年7月1日発行

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

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