

九州大学大学院 農学研究院
遺伝子資源開発研究センター

年報

第 5 号

平成 13 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	
2. 沿革	
3. 組織	
4. 研究および事業内容	
5. 運営委員会委員	
6. 組織図	
II. 研究成果	5
1. 研究業績・出版物リスト	
2. 原著論文要旨	
3. 総説等要旨	
4. 講演要旨	
III. センターの活動状況	57
1. 教育活動	
2. 科学研究費・共同、受託研究等	
3. 講演会・セミナー・講習会	
4. 海外渡航	
IV. 遺伝子資源系統の保存・管理	66
V. センター規程	73
VI. 英文摘要	75
VII. センター研究棟配置図	77
編集後記	

1. センターの概要

1. 目的

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

2. 沿革

- | | |
|---------|---|
| 昭和62年5月 | 本学附属家蚕遺伝子実験施設を振替え、附属遺伝子資源研究センターが10年の時限施設として設置され、教授、助教授、助手各2名が配置された。 |
| 平成元年4月 | 教授、助教授各1が追加配置された。
本学大学院農学研究科に設置された独立専攻遺伝子資源工学専攻の協力講座として、昆虫遺伝子資源学、遺伝子開発管理学の2講座に参加した。 |
| 平成3年4月 | 遺伝子資源工学専攻に微生物遺伝子工学講座が新設され、これに参加した。 |
| 平成9年4月 | 附属遺伝子資源研究センターは時限により廃止され、新たに、教授3名、助教授3名、助手2名の振替えによって附属遺伝子資源開発研究センターが設置された。 |
| 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	中村 隆
助手	山本 幸治	技能補佐員	江口 誠一
技官	西川 和弘	教務補佐員	何 寧佳
技官	西坂 章文		

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	非常勤技術員	上村 祐二、西 愛子
		非常勤補佐員	原田 良子、北野久美子、 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	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

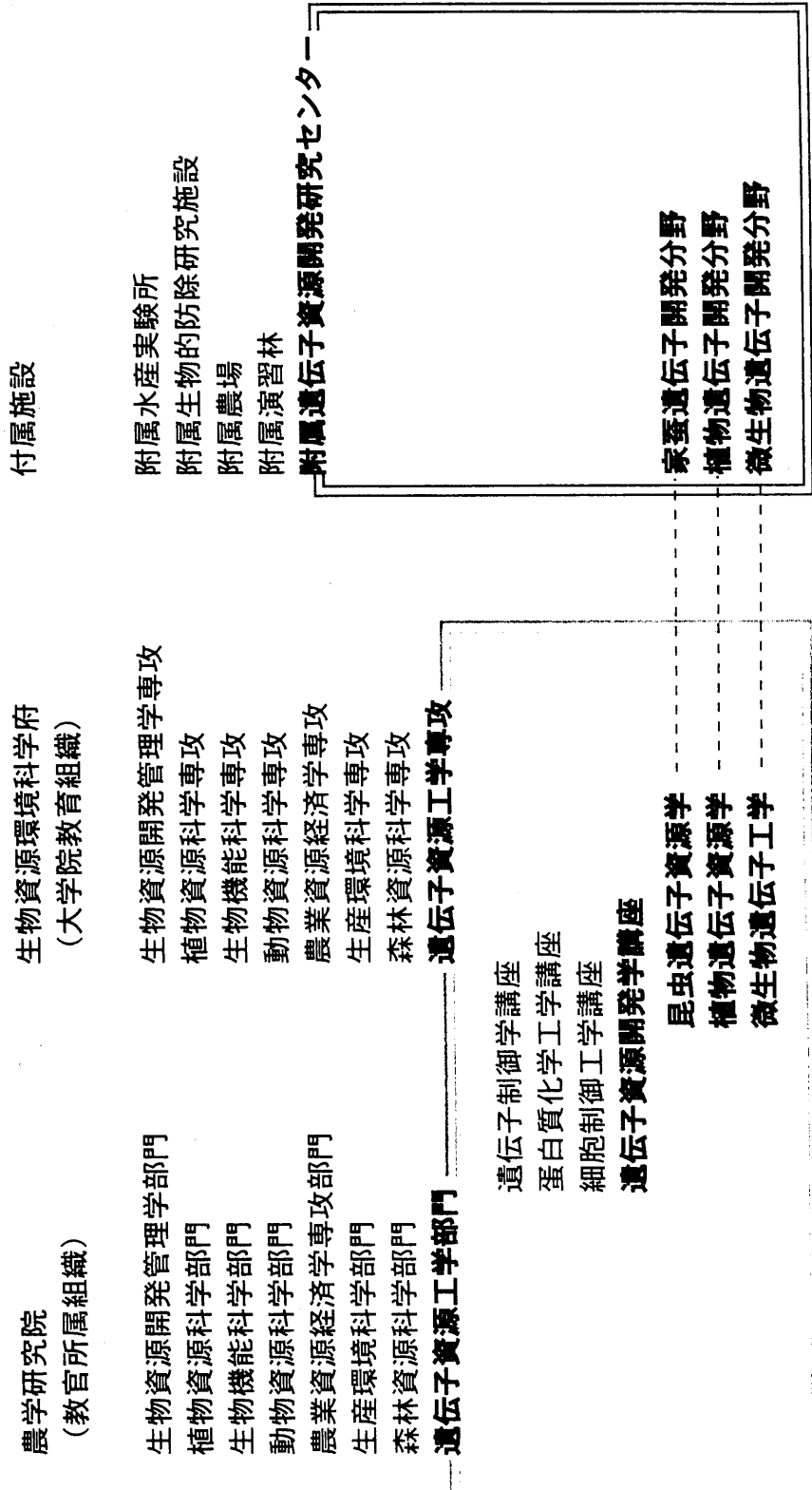
微生物遺伝子開発分野

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13年5月1日 現在）

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



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

- Banno, Y. , Fujii, H. and Doira, H.: Inheritance of one cocoon shape mutant named “Flossy cocoon” of the silkworm, *Bombyx mori*. *Journal of insect biotechnology and sericology*, **70**, 189-192 (2001)
- Nakamura, T., Banno, Y., and Fujii, H. : Genetics of the “wild silkworm translucent” mutant (*ows*), discovered in the progenies after cross between the domesticated silkworm, *Bombyx mori* and the wild mulberry silkworm, *Bombyx mandarina*. *Int. J. Wild silkmoth & silk*, **6**, 7-10 (2001)
- Xia Q. Y., Fujii H., Kusakabe T. and Banno Y.: Identification of three annexin IX isoforms generated by alternative splicing of the carboxyl-terminal exon in silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, **32**, 9-14 (2001)
- Yamamoto K., Fujii H., Kusakabe T., Koga K., Aso Y. and Ishiguro M.: Changes in phenoloxidase and its precursor during silkworm (a80 strain) development.. *J. Fac. Agr., Kyushu Univ.*, **45** (2), 487-493 (2001)

B その他

- 中村 隆, 伴野 豊, 藤井 博: クワコの自然集団中に見出された”くわこかすり変異体”の遺伝解析、日蚕九州講演集、**2**、27 (2001)
- 伴野 豊, 中村 隆, 藤井 博, 土井良 宏: 日本産クワコとカイコ染色体数の違いには第14連関群染色体が関与する、日蚕九州講演集、**2**、12 (2001)

- ・西坂章文, 野田真路, 田村 圭, 江口誠一, 中村 隆, 伴野 豊, 古賀 克己, 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 第二報、日蚕九州講演集、**2**、16 (2001)
- ・何 寧佳, 上野由宣, 藤井 博, 伴野 豊: カイコ体液Kunitz型キモトリプシンインヒビターのゲノム構造解析, 日蚕九州講演集, **2**, 19, (2001)
- ・上野由宣, 何 寧佳, 伴野 豊, 藤井 博: カイコ幼虫中腸の組織崩壊にともない発現する体液キモトリプシンインヒビター (CI-8) レセプターの同定および精製, 日蚕九州講演集, **2**, 25, (2001)

植物遺伝子開発分野

A 原著論文

- ・ A. Nishi, Y. Nakamura, N. Tanaka, H. Satoh (2001) Biochemical and genetic analysis of effect of *amylose-extender* mutation in rice endosperm. *Plant Physiol.* **127**, 459-472.
- ・ Dong D.L., H. Satoh, T. Kumamaru, Qu, L.Q. and U. S. Sadar (2001) Protein marker of BT type hybrid and its three lines in *japonica* rice (*Oryza sativa*, L.). *Chinese J. of Rice Sci.*, **15**, 165-168.
- ・ Jahan, M.S., T. Kumamaru, H. Satoh and A. Hamid (2001) Variation of glutelin seed storage protein in Bangladesh rice cultivars, a primary study. *Rice Genetics Newslett.* **18**, 18
- ・ Aung, Pa Pa, T. Kumamaru, and H. Satoh (2001) Genetic variation in seed storage protein glutelin of Myanmar local rice cultivars. *Rice Genetics Newslett.* **18**, 20
- ・ Aung, Pa Pa, T. Kumamaru, and H. Satoh (2001) Variation of three important starch characters in Myanmar local rice cultivars for cooking and eating quality. *Rice Genetics Newslett.* **18**
- ・ Tian H.D., T. Kumamaru, and H. Satoh (2001) Gene analysis of 57H mutant gene, *glup6*, in rice. *Rice Genetics Newslett.*, **18**

B データベース等

イネ保存系統データベース公開

http://w3.grt.kyushu-u.ac.jp/Rice_Kyushu/rice-kyushu/htdocs/main.html

微生物遺伝子開発分野

A 原著論文

- E. Yokoyama, K. Doi, M. Kimura and S. Ogata: Disruption of the *hup* gene encoding a histone-like protein HSI and detection of HSI2 of *Streptomyces lividans*, *Res. Microbiol.*, **152**, 717-723 (2001).
- A. Ishizaki, E. Takese, T. Ikai, S. Kumai, R. Nagano, K. Sonomoto, K. Doi, S. Ogata, Y. Kawamura and T. Ezaki: Taxonomic position of new bacteriocin (nukacin ISK-1) producer isolated from long-aged *Nukadoko*, *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **47**, 143-147 (2001).
- F. Inagaki, Y. Motomura, K. Doi, S. Taguchi, E. Izawa, Donald R. Lowe and S. Ogata: Silicified Microbial Community at Steep Cone Hot Spring, Yellowstone National Park, *Microbes and Environments*, **16**, 125-130 (2001).
- T. Eguchi, K. Kaminaka, J. Shima, S. Kawamoto, K. Mori, Seong-Hyun Choi, K. Doi, S. Ohmomo and S. Ogata: Isolation and Characterization of Enterocin SE-K4 Produced by Thermophilic Enterococci, *Enterococcus faecalis* K-4, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **65**, 247-253 (2001).
- 土居克実、江口智子、島 純、西山孝、大桃定洋、緒方靖哉: 「サイレージ乳酸菌の機能開発-サイレージ乳酸菌が保持するプラスミドの特性と利用開発-」、*生物工学会誌*, **79** (6), 177-179 (2001).
- S. Ogata: Biological and Molecular Investigations of Spontaneously Developing Pocks in *Streptomyces*, *Actinomycetol.*, **15**, 40-49 (2001).

・ T. Nishida, H. Kanazawa and T. Hara, Heat Resistance and Local Structure of FeCl₂-Absorbed Crosslinked Poly(γ -Glutamic Acid), *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, **250**, 547-550 (2001)

B 著書・総説

・ 緒方靖哉: 「『ヒトに優しく, 地球に優しい』ヒ乳酸菌研究の新世紀」, 生物工学会誌, **79** (6), 171-172 (2001).

・ 緒方靖哉: 「新規微生物現象の解明と応用に関する研究」, **76** (2), 102-113 (2002).

C プロシーディングス他

・ T. Hara, A Novel Cell-Free Translation/Glycosylation System, *Proc. Prospects for the Development of Insect Factories (Tukuba, Japan)*, 37-43 (2001).

・ 原敏夫: 「納豆の糸から納豆樹脂の開発とその利用」, 温故知新, **38**, 42-49 (2001)

・ 原敏夫: 「納豆樹脂の分子設計と機能化 -納豆の新たな有用性に迫る-」, *Science View*, **2**, 37-38 (2001)

・ 原敏夫: 「納豆樹脂の開発と緑化への取り組み」, 都市緑化技術, **42**, 46-49 (2001)

・ 原敏夫: 「納豆の糸で砂漠を緑化」, 三井グラフ, **127**, 28-29 (2002)

・ 原敏夫: 「納豆樹脂を活用したヘドロの有効利用技術の開発」, *Eco. Industry*, **7** (3), (2002)

・ 原敏夫: 「放射線照射による納豆樹脂の製造」, *Isotope News*, 2002年4月号

2. 原著論文要旨

家蚕遺伝子開発分野

Int. J. Wild Silkworm & Silk 6, 7–10 (2001)

©The Japanese Society for Wild Silkworms

Genetics of the “Wild Silkworm Translucent” Mutant (*ows*) Discovered in the Progenies after the Cross between the Domesticated Silkworm, *Bombyx mori* and the wild Mulberry Silkworm, *Bombyx mandarina*

Takashi Nakamura, Yutaka Banno* and Hiroshi Fujii

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

Abstract. Translucent mutant was spontaneously found in B₁F₂ progenies from the cross between *Bombyx mori* strain and *Bombyx mandarina* collected in Fukuoka prefecture Japan. This character is ascribed to a single recessive gene named “wild silkworm translucent” with the gene symbol *ows*. Linkage analysis showed that this gene was linked with *re* gene. A three-point test was performed by applying the genes *pe* (0.0) and *re* (31.7) as marker genes, and the *ows* locus was mapped to the 22.1 cM on the fifth linkage group.

Key words: *Bombyx mori*, *Bombyx mandarina*, wild silkworm translucent, linkage, larval skin, *ows*.

Introduction

In the silkworm, *B. mori*, many kinds of translucent mutants have been reported (Fujii *et al.*, 1998). The larval skin of the normal strain in *B. mori* is opaque and white in color, but that of these mutants are more or less translucent due to reduced amount of uric acid contained in the hypodermal cells. More than twenty such mutants are known to date are mapped to 16 linkage groups.

In 1995, one of the authors discovered a new mutant, which showed a similar phenotype to those of above-mentioned translucent mutants. This paper describes in detail the result of genetic analysis of the mutant.

Materials and Methods

New mutant

The mutant was discovered in the B₁F₂

progenies of the cross between the strain w43, which have been maintained in Kyushu University and the wild silkworm, *B. mandarina*, collected in Munakata city (Fukuoka prefecture). The larval skin of the mutant individuals manifest highly translucent.

Mating experiments

Linkage analysis was made by using autosomal marker genes, *P^m* (2), *Ze* (3), *L* (4), *re* (5), *E^{el}* (6), *Ia* (9), *K* (11), *ch* (13), *nb* (19), *Lan* (21), *mw* (22), *so* (26) and *Xan* (27). Each number in parentheses indicated the linkage group to which the marker gene belongs. When a recessive marker gene was used, segregation of F₂ was tested. When a dominant marker gene was used, segregation in the cross F₁ females × *ows/ows* males was examined.

Results and discussion

Establishment of *ows*

In 1995 summer, 15 translucent larvae

*Correspondence to: banno@agr.kyushu-u.ac.jp

Inheritance of One Cocoon Shape Mutant Named "Flossy Cocoon" of the Silkworm, *Bombyx mori*

Yutaka Banno*, Hiroshi Fujii and Hiroshi Doira

Institute of Genetic Resources, Kyushu University Graduate School of Bioresource and Bioenvironmental Sciences, Hakozaki 6-10-1, Fukuoka, 812-8581, Japan

(Received March 5, 2001; Accepted August 17, 2001)

In *Bombyx mori* a dominant, autosomal mutation was confirmed to produce loosely constructed, elliptic cocoons, which have a cotton-like texture. The mutant gene was named "flossy" with the symbol *Fl* after a previous achievement by Takasaki. Genetic analysis applying the genes *q* and *obt* as markers mapped the *Fl* locus to the 32.1 position on the seventh linkage group. The normal individuals segregating from *Fl* in a cross, using the *q* gene as a marker, gave tight cocoons with a peanut-like shape. No characteristics except the cocoon size and shape were different between *Fl* and normal individuals. It was concluded that the *Fl* gene function was related to the spinning behavior during the cocoon formation.

Key words: *Bombyx mori*, behavioral genetics, quantitative character, cocoon shape, genetic analysis

INTRODUCTION

The domesticated silkworm, *Bombyx mori*, is known to produce various shapes of cocoons. Those produced by major Japanese strains are elliptic but are apt to be constricted deeply at the middle, making a peanut-like shape, whereas those of Chinese strains are oval. In addition, there are spherical or spindle cocoons, depending on the race or strain. Usually *B. mori* spins tightly constructed cocoons, but often some races or strains produce the cocoons that are loosely constructed such as a cotton-like texture. The shape and tightness of cocoons are strongly correlated to the reeling efficiency and are important characters for the sericulture. Moreover, these cocoon traits may be determined by inherited manners of spinning regulated by the nervous system and are expected to be of value for the behavioral genetics. Many silkworm geneticists have therefore been focusing on the cocoon trait analyses. However, simple Mendelian inheritance is rarely observed when strains with different cocoon shapes are crossed, indicating that their inheritance is mostly polygenic (Morohoshi, 1952). On the other hand, a mutation whose cocoon is loosely spun was shown to be controlled by a single dominant gene (Akiyama and Yasui, 1921; Takasaki, 1947). Thus, the gene has been called the "flossy" with the symbol of *Fl* (Takasaki, 1947; Chikushi, 1972; Tazima *et al.*, 1975). However, the further genetic characterization of this mutation remained to be elucidated. Here we perform for the first time the linkage analysis and mapping of a gene

bringing about the looseness of cocoon textile. Also the mutant individuals were characterized in comparison with the normal ones having the same genetic background.

MATERIALS AND METHODS

The silkworm strain k12, which shows the loose cocoon character, was used in this experiment. This strain had been supplied by Dr. H. Hashimoto of the Sericultural Experiment Station (Matsumoto) in 1966 and maintained thereafter in Kyushu University (Fujii *et al.*, 1998). Linkage analysis for the mutant was made by using the autosomal marker genes *Y* (2), *Ze* (3), *L* (4), *oc* (5), *E^{el}* (6), *q* (7), *st* (8), *la* (9), *K* (11), *C* (12), *ch* (13), *U* (14), *bl* (15), *cts* (16), *bts* (17), *mln* (18), *oh* (20), *mw* (22), *tub* (23), *Sel* (24) and *so* (26). Each number in parentheses indicates the linkage group to which the marker gene belongs. When a recessive marker gene was used, segregation of the phenotype to be analyzed was tested in the back cross: F₁ females x marker males. When a dominant marker gene was used, segregation was examined in the cross: F₁ females x normal type males. A three-point test was done as described below.

RESULTS AND DISCUSSION

Establishment of cocoon mutation

The cocoons of the strain k12 have been characterized by their loose texture, as well as by the golden yellow color (Fujii *et al.*, 1998). In 1977, seven individuals out of 287 from this strain were found to spin normal tight cocoons, while the remaining 280 made loose cocoons. Again in 1978, ten tight cocoons segre-

*To whom correspondence should be addressed.

Fax & Tel: +81-92-624-1011.

Email: banno@agr.kyushu-u.ac.jp

Identification of three annexin IX isoforms generated by alternative splicing of the carboxyl-terminal exon in silkworm, *Bombyx mori*[☆]

Qing-You Xia^a, Hiroshi Fujii^{a,*}, Takahiro Kusakabe^b, Yutaka Banno^a

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

^b Department of Applied Genetics and Pest Management, Faculty of Agriculture, Kyushu University, 6-10-1, Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka 812-8581, Japan

Received 26 December 2000; received in revised form 6 March 2001; accepted 12 March 2001

Abstract

Annexins (ANXs) are a family of structurally related proteins with Ca²⁺-dependent phospholipid-binding properties. Here we report the cloning of three cDNAs each encoding annexin IX (ANX IX) isoforms from unfertilized eggs of the silkworm, *Bombyx mori*. The analysis of exon/intron structures showed that the three mRNAs, named ANX IX-A (2300 bp), ANX IX-B (1884 bp) and ANX IX-C (1409 bp), respectively, were generated from a single gene by alternative usage of a 3'-splice site of the last exon. Thus the three isoforms have an identical sequence from amino acid residues 1 to 307 and this region shows approximately 77% identity to *Drosophila melanogaster* ANX IX. Only amino acid residues 308–324 (A) or 308–323 (B and C), which correspond to the C-terminal tail, are different in the three proteins. A RT-PCR analysis indicated that the three isoforms of silkworm ANX IX were specifically expressed in various larval tissues and development stages. Interestingly, the C-terminal tail in ANXs I, II and V were previously confirmed as a binding region for protein kinase C. Thus generation of the three ANX IX isoforms in the silkworm, that are different from other ANXs, may have a functional significance other than binding to Ca²⁺. © 2001 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

Keywords: Annexin IX; Isoforms; Alternative splicing; Molecular sequence data; Protein kinase C; Silkworm; *Bombyx mori*

1. Introduction

Annexins (ANXs) are Ca²⁺-dependent phospholipid-binding proteins that are abundant in the eukaryotic kingdom (reviewed by Niki et al., 1996; Moss, 1997; Benz and Hofmann, 1997). To date, at least 10 ANX genes have been reported in mammals and each of them shows cell-specific expression. It has been proposed that ANXs play roles in biological important functions such as membrane fusion, control of cell proliferation and differentiation, regulation of phospholipase A2 activity, and a number of other cellular processes (Niki et al., 1996). Structural analysis shows that members of ANXs family are made up of a short N-terminal tail domain and core

domains, which consist of four or eight conserved repeats of approximately 70 amino acids residues (Moore, 1986). The N-terminal tail, which shows large variations both in sequence and length, has been extensively studied and proposed to be responsible for functional specificity. The highly conserved C-terminal core domain, on the other hand, has been generally thought to confer the family's common Ca²⁺-binding activity (Niki et al., 1996; Moss, 1997). However, this region may also have the glycosaminoglycan (Ishitsuka et al., 1998) and protein kinase C (Mochly-Rosen et al., 1991a) binding activities. The latter property was found in mammalian ANXs I, II, and V (Mochly-Rosen et al., 1991b; Roth et al., 1993; Dubois et al., 1998), although direct evidence for these other functions of individual ANX members is extremely limited.

In insect, only ANX IX and X genes have been found in *Drosophila melanogaster* (Johnston et al., 1990). Although the functions of insect ANXs have not been studied in detail, a comparison of vertebrate and invertebrate ANXs suggests that they are derived from a com-

[☆] The nucleotide sequence reported in this paper has been submitted to GenBank under accession numbers AB030496, AB030497, AB030498 (cDNA) and AB031208 (gene).

* Corresponding author. Tel.: +81-92-621-4991; fax: +81-92-624-1011.

E-mail address: fujii@agr.kyushu-u.ac.jp (H. Fujii).

Change in phenoloxidase and its precursor during silkworm (a80 strain) development

Kohji Yamamoto^{1,4)}, Hiroshi Fujii²⁾, Takahiro Kusakabe³⁾, Katsumi Koga³⁾, Yoichi Aso⁴⁾, and Masatsune Ishiguro^{*4)}

¹⁾ The University of Texas Health Center at Tyler, 11937 HWY 271 Tyler TX 75708, U. S. A.

²⁾ Laboratory of Silkworm Genetics, ³⁾ Laboratory of Sericultural Science, and

⁴⁾ Laboratory of Protein Chemistry and Engineering, Graduate School of Bioresource and Bioenvironmental Sciences, Kyushu University, 6–10–1 Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka 812–8581, Japan.

(Received October 31, 2000 and accepted November 10, 2000)

The changes in phenoloxidase and its precursor, so-called prophenoloxidase, of the silkworm, *Bombyx mori* (a80 strain) were examined using detection assay with or without detergent to distinguish PO and pro-PO in hemolymph (Yamamoto, *et al.*, 1999). Little or no phenoloxidase activity was detected in hemolymph at the silkworm development during the final larval instar and pupal stage. On the other hand, prophenoloxidase was detected for same time frame. In males, after prophenoloxidase increased slightly at day 4, it decreased to a minimum level at spinning and increased to a maximum level on the day of pupation and decreased gradually to day 5 after pupation. In females, prophenoloxidase decreased gradually to a minimum level on day of spinning and a slight increase was observed at day 8 and it increased to maximum level between day 2 and 3 after pupation and decreased thereafter. Prophenoloxidase mRNA expression was preceded a day or two before, when comparing the change of phenoloxidase mRNA with its product.

INTRODUCTION

Phenoloxidase (PO: monophenol, dihydroxyphenylalanine; oxygen oxidoreductase; EC 1.14.18.1) catalyzes two sequential reactions; the hydroxylation of monophenol to *o*-diphenol and the oxidation of *o*-diphenol to *o*-quinone (Ashida and Yamazaki, 1990). In insects, PO is generally believed to be crucial for the cuticular melanization and sclerotization (Söderhäll, 1982; Hiruma and Riddiford, 1988; Sugunaran *et al.*, 1992).

The existence of a precursor protein, called prophenoloxidase (pro-PO), was reported from many insects: e.g., the fruit fly *Drosophila melanogaster* (Fujimoto *et al.*, 1993), the silkworm *Bombyx mori* (Yasuhara, *et al.*, 1995; Yamamoto, *et al.*, 1999), the tobacco hornworm *Manduca sexta* (Hall, *et al.*, 1995), the cockroach *Blaberus discoidalis* (Durrant, *et al.*, 1993), the wax moth *Galleria mellonella* (Kopacek, *et al.*, 1995), and a coleopteran insect *Holotrichia diomphalia* (Kwon, *et al.*, 1997). The activation of pro-PO have been shown by the prophenoloxidase-activating factor *in vitro* (Lee, *et al.*, 1998; Jiang, *et al.*, 1998; Satoh, *et al.*, 1999) and by organic compounds such as sodium dodecyl sulfate (Funatsu and Inaba, 1962; Inaba and Funatsu, 1964), cetylpyridinium chloride (Hall, *et al.*, 1995), 2-propanol (Asada, *et al.*, 1993) and dimethylbenzylmethylammonium chloride (DBMA) (Yamamoto, *et al.*, 1999). Furthermore, the

* Corresponding author. FAX number: 092-642-3051, E-mail: ishiguro@agr.kyushu-u.ac.jp.

Biochemical and Genetic Analysis of the Effects of *Amylose-Extender* Mutation in Rice Endosperm

Aiko Nishi, Yasunori Nakamura, Naoki Tanaka, and Hikaru Satoh*

Faculty of Agriculture, Kyushu University, Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka 812-8581, Japan (A.N., H.S.); Faculty of Bioresource Sciences, Akita Prefectural University, Shimoshinjo-Nakano, Akita-City 010-0195, Japan (Y.N.); National Institute of Agrobiological Sciences, Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8602, Japan (N.T.); and Japan Science and Technology Corporation, Honcho, Kawaguchi, Saitama 332-0012, Japan (N.T.)

Biochemical analysis of *amylose-extender* (*ae*) mutant of rice (*Oryza sativa*) revealed that the mutation in the gene for starch-branching enzyme IIb (BEIIb) specifically altered the structure of amylopectin in the endosperm by reducing short chains with degree of polymerization of 17 or less, with the greatest decrease in chains with degree of polymerization of 8 to 12. The extent of such change was correlated with the gelatinization properties of the starch granules, as determined in terms of solubility in urea solution. The *ae* mutation caused a dramatic reduction in the activity of BEIIb. The activity of soluble starch synthase I (SSI) in the *ae* mutant was significantly lower than in the wild type, suggesting that the mutation had a pleiotropic effect on the SSI activity. In contrast, the activities of BEI, BEIIa, ADP-Glc pyrophosphorylase, isoamylase, isoamylase, pullulanase, and Suc synthase were not affected by the mutation. Therefore, it is stressed that the function of BEIIb cannot be complemented by BEIIa and BEI. These results strongly suggest that BEIIb plays a specific role in the transfer of short chains, which might then be extended by SS to form the A and B₁ chains of amylopectin cluster in rice endosperm.

Starch is composed of two types of molecule, namely amylose and amylopectin. Amylose is an essentially linear molecule composed of $\alpha(1\rightarrow4)$ -linked glucosidic chains, whereas amylopectin is a highly branched glucan with $\alpha(1\rightarrow6)$ glucosidic bonds that connect linear chains. The $\alpha(1,4)$ chains of amylopectin consist of A chains that carry no additional chains, B chains that carry A chains or other B chains, and a C chain that includes the reducing terminus (Peat et al., 1952). Hizukuri (1986) proposed a cluster model for amylopectin. In this model, A and B₁ chains form a single cluster, whereas B₂ and B₃ chains extend to two and three clusters, respectively. Hanashiro et al. (1996) proposed that, in amylopectin, chains of degree of polymerization (DP) ≤ 12 , $13 \leq DP \leq 24$, $25 \leq DP \leq 36$, and $DP \geq 37$ correspond to A chains, B₁ chains, B₂ chains, and B₃ and longer chains, respectively.

Amylose is synthesized by ADP-Glc pyrophosphorylase (AGPase) and granule-bound starch synthase I (GBSSI), which is encoded by the *Waxy* gene. Amylopectin is synthesized by concerted reactions catalyzed by AGPase, soluble starch synthase (SS), starch-branching enzyme (BE), and starch-debranching enzyme. BE is the only enzyme that can introduce $\alpha(1,6)$ -glucosidic linkages into α -polyglucans and, therefore, it plays an essential role in the biosynthesis of amylopectin. The BEs from various higher plants appear to be composed of two types, namely BEI and

BEII from maize (*Zea mays*; Boyer and Preiss, 1978a; Fisher and Boyer, 1983; Guan and Preiss, 1993; Guan et al., 1997), wheat (*Triticum aestivum*; Morell et al., 1997), and barley (*Hordeum vulgare*; Sun et al., 1997), and the A-type and B-type from pea (*Pisum sativum*; Burton et al., 1995; Martin and Smith, 1995) and potato (*Solanum tuberosum*; Larsson et al., 1996, 1998). At least three isoforms of BE have been identified in rice (*Oryza sativa*) endosperm (Mizuno et al., 1992; Nakamura et al., 1992). Yamanouchi and Nakamura (1992) resolved the BE of the developing endosperm, leaf blade, leaf sheath, culm, and root of rice into two types, BEI and BEII. The BEI type consists of only a single isoform, whereas the BEII type consists of multiple isoforms. The endosperm contains the two isoforms BEIIa (QEIIb) and BEIIb (QEIIa). BEIIb has been detected only in the endosperm, whereas BEIIa has been found in all organs.

Biochemical analysis of purified isoforms of BEI and BEII from maize endosperm indicated that BEI preferentially branches amylose-type, fewly branched polyglucans, as compared with BEII, whereas BEII has a higher capacity than BEI for branching amylopectin-type, highly branched glucans (Guan and Preiss, 1993; Takeda et al., 1993; Guan et al., 1997). These observations strongly suggest that BEI and BEII might play distinct roles in the construction of amylopectin molecules. However, the significance of the multiple isoforms of BEII have not yet been clarified.

BEIIb-deficient mutants have been isolated from maize and pea. In maize, they have been designated as *amylose-extender* (*ae*) mutants and have detected in the endosperm (Boyer and Preiss, 1978b; Stinard et al., 1993). The corresponding *rugosus* (*r*) mutants in

* Corresponding author; e-mail hsatoh@agr.kyushu-u.ac.jp; fax 81-92-642-3056.

Article, publication date, and citation information can be found at www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.010127.

Protein Markers of BT Type Hybrid and Its Three Lines in Japonica Rice (*Oryza sativa* L.)

HONG De-lin^{1,2}, H SATOH¹, T KUMAMARU², QU Le-qing², U S SADAR²

(¹ Department of Agronomy, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; E-mail: nndn@public1.ptt.js.cn; ² Faculty of Agriculture, Kyushu University, Hakozaki, Fukuoka 812-0081, Japan)

BT 型杂交粳稻育性及其三系的若干蛋白质标记

洪德林^{1,2} 佐藤光² 熊丸敏博² 曲乐庆² U S SADAR²

(¹ 南京农业大学 农学系, 江苏 南京 210095; E-mail: nndn@public1.ptt.js.cn; ² 九州大学 农学部, 日本 福冈市箱崎 812-0081)

摘要:用十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)方法,对粳稻BT 细胞质雄性不育系六千辛A,保持系六千辛B,恢复系六千辛R,77302-1,以及杂交组合六千辛A/77302-1的F₁和F₂种子的胚乳贮藏蛋白进行了分析。结果表明,在谷蛋白α-3区域,恢复系有两条带α-3a和α-3b,而六千辛A和六千辛B只有一条带α-3。F₂代具有α-3的种子 and 具有α-3a加α-3b的种子1:1分离。谷蛋白α-4带的移动速率,恢复系比六千辛A快。把较快的α-4带记为α-4f。F₂代具有α-4的种子 and 具有α-4加α-4f的种子也是1:1分离,与配子体不育类型的F₂代花粉育性恢复基因分离比一致。系谱分析表明六千辛R中α-3a和α-3b来源于IR8。六千辛A比六千辛B容易提取醇溶蛋白。

关键词: 粳稻; 恢复系; 细胞质雄性不育系; 蛋白质标记; 杂交水稻; 谷蛋白; 醇溶蛋白

中图分类号: Q946.1; S511.01

文献标识码: A

文章编号: 1001-7216(2001)03-0165-04

Abstract: Seeds of CMS line Liuqianxin A with BT cytoplasm, maintainer line Liuqianxin B, restorer lines Liuqianxin R, 77302-1, F₁ and F₂ of Liuqianxin A/77302-1 in japonica rice were analyzed for endosperm storage proteins by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Results showed that in glutelin α-3 area, restorer lines had two bands α-3a and α-3b while Liuqianxin A and Liuqianxin B had only one band α-3. In F₂ generation, seeds with α-3 and seeds with α-3a plus α-3b segregated into 1:1 ratio. Moving rate of glutelin α-4 band in restorer lines was faster than that in Liuqianxin A. The faster α-4 was designated as α-4f. Seeds with α-4 and seeds with α-4 plus α-4f also segregated into 1:1 ratio in F₂, which are consistent with the segregation of restorer gene of gametophytic type. Pedigree analysis indicates that the bands α-3a and α-3b in Liuqianxin R derived from IR8. Prolamin in Liuqianxin A is easier to extract than that in Liuqianxin B.

Key words: japonica rice; restorer line; cytoplasm male sterile line; protein marker; hybrid rice; glutelin; prolamin

In order to find a method of inspecting seed purity indoor in japonica hybrid rice with BT type cytoplasm, short root gene *srt1* in japonica rice had been tried^[1-3], however, it has not been successful yet. As genetic markers, seed storage proteins are characterized by a high level of polymorphism, limited environmental influence on their electrophoretic patterns, and a simple genetic control^[4]. Therefore, we analyzed seed storage proteins of CMS line with BT type cytoplasm, maintainer line, restorer line, hybrids F₁ and F₂ in japonica rice to find protein markers that can be used for the purpose mentioned above.

1 Materials and Methods

1.1 Plant materials

Kinmaze (CK), CMS line Liuqianxin A, its maintainer line Liuqianxin B, restorer lines Liuqianxin R, 77302-1, Ninghui 3-2, C57, F₁ and F₂ of Liuqianxin A/77302-1, Chin-

surah Boro I, TN1, IR8 and IR24 were used in this study. Liuqianxin A was released in 1984 and has been back-crossed 30 generations with Liuqianxin B up to 1998. Isogenic restorer line Liuqianxin R was obtained by back-crossing Liuqianxin A (as recurrent parent) using 77302-1 as donor of pollen fertility restorer gene, and has been back-crossed 8 generations up to 1998^[5]. Restorer 77302-1 was bred by crossing C57 (as female) with IR28 and released in 1984. Restorer gene in 77302-1 derived from C57 because IR 28 had no restorer gene^[4], restorer gene in C57 from IR8^[7]. Seeds of Liuqianxin A, the F₁ of Liuqianxin A/77302-1, Ninghui 3-2, and C57 were harvested at Experimental Station, Nanjing Agricultural University in 1998. Kinmaze, Chinsurah Boro I, TN1, IR8, IR24 and the F₂ seed were harvested at Farm of Kyushu

Received date: 2000-06-19; **Revised date:** 2000-09-27.

第一作者简介: 洪德林(1957-),男,博士,教授。

18. Variation of three important starch characters in Myanmar local rice cultivars for cooking and eating quality.

PA PA AUNG, T. KUMAMARU and H. SATOH

Laboratory of Plant Genetic Resources, Kyushu University, Faculty of Agriculture, Hakozaki, Fukuoka, 812-8581 Japan

The cooking and eating quality preferences vary with the country (Azceez and Shafi, 1966). Gelatinization temperature, amylose content and gel consistency are important starch properties in rice, because these traits influence the cooking and eating characteristics.

In the present study, the magnitude of variations in three starch characters among the Myanmar local rice cultivars were investigated to make a breeding program for improving grain quality of rice.

One hundred and fifty local rice cultivars from six distinct regions, provided by the Seed Bank of Myanmar, were analyzed. The alkali spreading score was measured for each grain using the method of Little (1958). Amylose content was estimated by using the DU 7500 spectrophotometer (Beckman) according to Satoh (1990). The gel consistency was determined using the method of Cagampang (1973).

Alkali digestibility score is the indicator determining the cooking quality because of its close linkage with gelatinization temperature of starch. Of the 150 cultivars, 94 showed low scores for alkali digestibility ranging from 1 to 3; 53 showed intermediate scores ranging from 4 to 6; and 3 showed high scores ranging from 7 to 9 (Table 1). Most of Myanmar local rice cultivars were more resistant and undecomposable to alkali.

Amylose contents of Myanmar local rice cultivars ranged from 0 to 30% (Table 2). A wide range of regional variation in amylose content was observed.

Varieties having same amylose content may differ in tenderness and therefore, the cooked rice may be differentiated by the gel consistency test (Cagampang *et al.*, 1973). The gel consistency test is based on the consistency of rice paste. A wide range of variation in gel consistency value among Myanmar local rice cultivars was also found, ranging from 5 to 100 mm

Table1. Variation in alkali digestibility score among Myanmar local rice cultivars and its geographical distribution

Scores	Regions						Total
	WMR	NMR	EMR	DR	CSR	CDZ	
1	0	5	1	23	1	4	34
2	0	4	0	14	4	5	27
3	0	3	1	18	5	6	33
4	0	5	0	16	4	5	30
5	0	4	0	4	3	4	15
6	1	1	0	3	1	2	8
7	0	0	0	1	1	1	3
8	0	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0	0

Low alkali digestibility 63%; Intermediate alkali digestibility 35%; High alkali digestibility 2%

WMR= Western Mountain Region, NMR= Northern Mountain Region, EMR= Eastern Mountain Region, DR= Delta Region, CSR= Coastal Strip Region, CDZ= Central Dry Zone

20. Genetic variation of glutelin seed storage protein in Myanmar local rice cultivars

PA PA AUNG, T. KUMAMARU and H. SATOH

Laboratory of Plant Genetic Resources, Kyushu University, Faculty of Agriculture, Hakozaki, Fukuoka, 812-8581 Japan

Seed storage protein diversity is important for breeding improved nutritional quality of rice and for varietal identification. Rice glutelin is composed of two major subunits: an acidic subunit with molecular mass of 40 kD and a basic subunit with molecular mass of 20 kD (Wen and Luthe 1985; Krishnan and Okita 1986). This paper deals with the genetic variation of a seed storage protein, glutelin, observed in Myanmar local rice cultivars.

One hundred and fifty local rice cultivars collected from six distinct regions, obtained from Seed Bank of Myanmar, were analyzed by SDS-PAGE and IEF. Japonica cultivar Kinmaze and indica cultivar IR 36 were used as control. SDS-PAGE was carried out using the discontinuous buffer system of Laemmli (1970). IEF gels were prepared and used as described by Brinegar and Peterson (1982). Gels were composed of 8.5M urea, 30% acrylamide, 1.5% bis-acrylamide, 20% Nonidet P-40 and 2% ampholine with pH (3.5 - 10); (6 - 8): (8 - 10.5) = 1:1:1.

Two types of variation for glutelin subunit were detected in Myanmar local rice cultivars, based on molecular mass of α -3 band. Type A was characterized by low molecular mass of α -

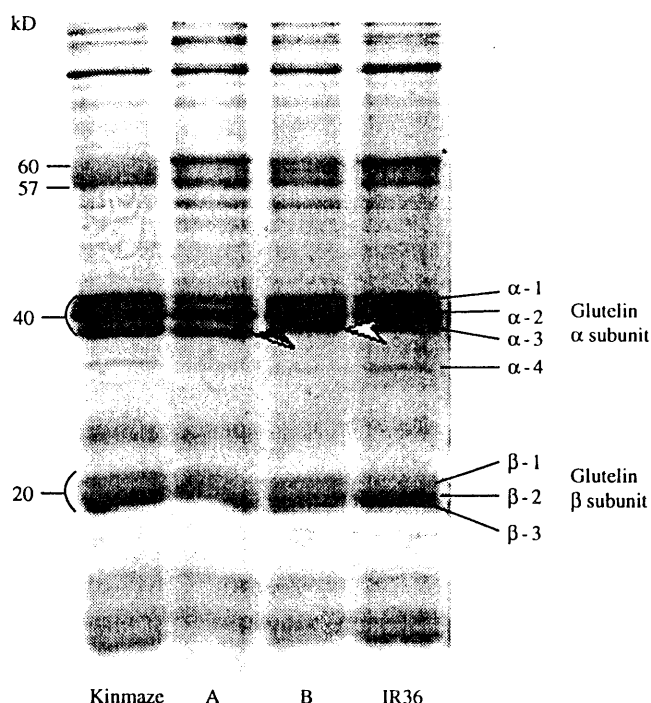


Fig. 1. Variation of glutelin α subunit in Myanmar local rice cultivars. A: Same as Kinmaze (Low molecular mass of α -3) B: Same as IR 36 (High molecular mass of α -3) (Black arrow head and white arrow head indicate low molecular mass of α -3 and high molecular mass of α -3 band, respectively.)

19. Gene analysis of new 57H mutant gene, *glup6*, in rice

H. D. TIAN¹, T. KUMAMARU¹, Y. TAKEMOTO¹, M. OGAWA² and H. SATOH^{1*}

1) Laboratory of Plant Genetic Resources, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Fukuoka, 812-8581 Japan

2) Department of Domestic Economy, Yamaguchi Prefecture University, Yamaguchi, 753-8502 Japan

Rice storage proteins, prolamin and glutelin, are deposited into the separated protein bodies (PBs). Glutelin synthesized as 57 kD precursor on the ER, is transported via the Golgi body, cleaved into 40 kD α and 20 kD β subunits and accumulated into PB II in the vacuole (Yamagata and Tanaka, 1986). 57H mutants with the high amount of 57 kD polypeptides and the low amount of two glutelin subunits are good materials for studying gene mechanism controlling glutelin accumulation in rice. So far, 6 genes, *esp2*, *Glup1*, *glup2*, *glup3*, *glup4* (Satoh *et al.* 1999) and *Glup5* (not published) have been identified for 57H mutation. However, identification of new genetic materials is necessary to resolve overall the gene mechanisms controlling glutelin accumulation. In this study, we identified a new 57H gene using 57H mutant (EM939) derived from the MNU treatment of rice cultivar Taichung65 (T65).

SDS-PAGE analysis of total seed proteins in 57H mutants showed that EM939 increased the amount of 57 kD polypeptides, decreased the amount of the two glutelin subunits and decreased the amount of 26 kD globulin and 13 kD b prolamin (26L, 13bL) compared with T65 (Fig. 1A). Western-blot analysis revealed stronger reactivity of 57 kD polypeptides in EM939 with anti-glutelin antibody, confirming that the increase of 57 kD polypeptides in EM939 resulted from high deposition of glutelin precursor (Fig. 1B).

F₁ seeds obtained from the cross between EM939 and T65 showed normal type. In the F₂ seeds (178 grains), the segregation mode of normal (135 grains) and 57H (43 grains) types fitted well to the expected monogenic ratio of 3:1, indicating that 57H mutation of EM939 was controlled by a single recessive gene. Furthermore, we found that 26L and 13bL types co-segregated with 57H type, suggesting that the decrease of 26 kD globulin and 13 kD b

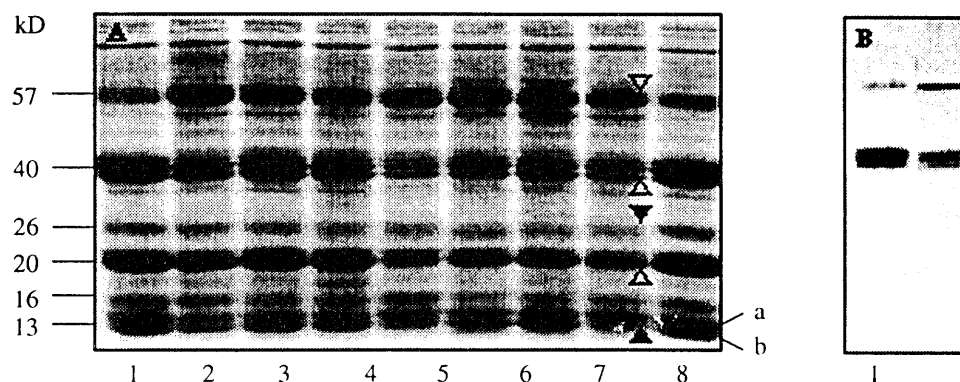
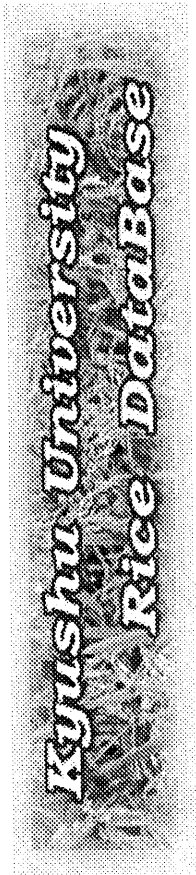


Fig. 1. SDS-PAGE (A) and Western-blot (B) analyses of total proteins from a single grain of each 57H mutants. A1 and A9: Original cultivars, Kinmaze and T65; A2: CM1787 (*esp2*); A3: EM61 (*Glup1*); A4: EM305(*glup2*); A5: EM856 (*glup3*); A6: EM956 (*glup4*); A7: EM675 (*Glup5*); A8: EM939. The triangles, ∇ , Δ , \blacktriangledown and \blacktriangle indicate respectively the increased glutelin precursor, decreased glutelin subunits, and decreased 26 kD globulin and 13 kD b prolamin in EM939. B1: T65; B2: EM939, glutelin subunit antibody was used.



● About This DataBase

国内外の品種系統

- HO系統 品種別 Browse
- 地域別 Browse
- HO番号 Browse
- HO系統 Target Search
- HO系統 char Target Search

FAO国際共同研究供試品種

- IBP系統 品種別 Browse
- 地域別 Browse
- IBP番号 Browse
- IBP系統 Target Search
- IBP系統 char Target Search

国内外の陸稲品種

- UP系統 品種別 Browse
- UP番号 Browse
- UP系統 Target Search
- UP系統 char Target Search

サイレージ乳酸菌の機能開発—サイレージ乳酸菌が
保持するプラスミドの特性と利用開発—土居 克実^{1*}・江口 智子¹・島純²・西山 孝¹・大桃 定洋²・緒方 靖哉¹

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や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、材料草に付着した枯草菌や *Clostridium* 属細菌などの生育が乳酸菌の増殖に先んじて起こり、乳酸発酵が十分に行われないことや、ファージ汚染により乳酸菌が死滅、または、きわめて悪い生育状況となることなどが挙げられる。これまで西南暖地に適応したサイレージ乳酸菌の作出を目的とし、有用特性を持つ菌株を分離したが、¹⁾ これらの中には、プラスミドを保持する株が多く見られ、ファージ耐性、バクテリオシン生成、細胞外多糖生産などの有用特性の多くがプラスミド上にコードされている。本論では、サイレージ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ジ乳酸菌作出の試みを報告する。

1. ファージ耐性プラスミドの複製機構の解明とベクター化

ファージ感染は乳酸菌を利用した産業では深刻な問題であり、ファージ汚染防御のために製造工程の改良や製造環境の整備をはじめ、使用菌株のローテーションなどの工夫がなされている。近年、これらの防御策の他に乳酸菌株が示すファージ耐性機能を遺伝子工学的に利用する試みが始まっており、その多くが特許化されている。²⁾ ファージ感染防御機能は、吸着阻害、DNA注入阻害、制限修飾系 (R/M系)、感染不全 (Abortive infection: Abi) などがあり、これらの機能の多くはプラスミド上にコードされている。

西南暖地で分離したサイレージ乳酸菌 *L. plantarum* NGRI0101 株は、数種のファージに対し耐性を示すが、これは本菌株が保有するプラスミド pLKS (2,025 bp) が機能しているためであることが分かった。pLKS の全塩基配列を決定し、ORF の解析を行ったところ、pLKS 上には *rep* 遺伝子と *ori* が同定された以外に既知の遺伝子と有意な相同性を見いだすことはできなかった。pLKS は小サイズであるため、多数の遺伝子群が関与する DNA 注入阻害や R/M 系をコードすることは不可能と

考えられた。本 pLKS を保有している株はファージを吸着でき、また pLKS 欠落株において EOP やブラックサイズの増加などファージ感受性にも差が認められた。したがって、本プラスミドのファージ増殖阻害作用はファージと pLKS の互いに類似する *Rep* や *ori* 間で起こるファージ DNA 複製の拮抗阻害によると推察した。³⁾ この阻害も一種の Abi 機構に属すると考えられる。

上記の推察に加え、pLKS のような小サイズプラスミドはベクターへの開発に優位であるので、本プラスミドの複製機構を解明してサイレージ乳酸菌のベクターを開発することとした。プラスミドの複製機構は、 σ 型と θ 型に大別される。両者の違いは、 σ 型複製が比較的小サイズのプラスミドで見られ、著量の一鎖複製中間体が蓄積するのに対し、 θ 型複製は大サイズのプラスミドによく見られ、 σ 型複製に比べ、安定的に複製が行われると言われている。乳酸菌プラスミドは、 σ 型複製 (pC194-型や pE194-型等) を行うものが多く、小サイズでかつ cryptic なものが多い。小サイズプラスミドは選択マーカーとなる薬剤耐性遺伝子の付加にも寛容であり、通常コピー数が多いため、目的遺伝子の大量調製や発現などに有用である。さらに σ 型プラスミドは一般に宿主域が広く、ベクターとして優位である。 σ 型複製を行う乳酸菌プラスミドベクターの代表は、*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* Wg2 株のプラスミド pWVO1 由来の pGK12 が挙げられる。しかしながら、安定性が求められるベクターとしては、 θ 型複製を行うプラスミドの複製機構の方が好適であるとされており、 θ 型複製機構を利用したベクターとしては *Streptococcus agalactiae* の pIP501 由来の pSA3 や *Enterococcus faecalis* の pAM β 1 由来の pIL252 などがよく利用されている。

そこで、pLKS の *Rep* およびデータベースに登録されているプラスミドの *Rep* のアミノ酸配列を基に系統樹を作製した (Fig. 1)。その結果、 σ 型と θ 型のプラスミドの *Rep* は大きく区別でき、また、宿主間の類縁性と同調的に分類できた。この結果、pLKS の *Rep* は θ 型複製プラスミドのものに属していた。さらに、*ori* 領域の塩基配列や一鎖複製中間体の蓄積が認められないことなどから、pLKS は小サイズであるにも関わらず、 θ 型複製を行うことが明らかになった。本プラスミドを利用したベクターの構築に期待がもたれる。

2. バクテリオシン生産性プラスミドの解析とバクテリオシンのサイレージへの利用

* 著者紹介 (代表) 九州大学大学院 農学研究院 遺伝子資源工学部門 (講師)

〒812-8581 福岡市東区箱崎6-10-1 TEL/FAX. 092-642-3059 E-mail: doi@agr.kyushu-u.ac.jp

¹九州大学大学院農学研究院遺伝子資源工学部門微生物遺伝子工学分野、²農林水産省

Short Communication

Taxonomic position of new bacteriocin (nukacin ISK-1) producer isolated from long-aged *Nukadoko*

Ayaaki Ishizaki, Emi Takese, Takako Ikai, Sadato Kumai, Rie Nagano, Kenji Sonomoto,*
Katsumi Doi,¹ Seiya Ogata,¹ Yoshiaki Kawamura,² and Takayuki Ezaki²

Microbial Technology Division, Department of Biochemistry and Biotechnology, Faculty of Agriculture,
Graduate School of Kyushu University

¹ Microbial Genetics Division, Institute of Genetic Resources, Faculty of Agriculture,
Graduate School of Kyushu University, Fukuoka 812–8581, Japan

² Department of Microbiology, Gifu University School of Medicine, Gifu 500–8705, Japan

(Received October 29, 2000; Accepted April 20, 2001)

Key Words—lantibiotic; nukacin; *Nukadoko*; *Staphylococcus warneri*

The new lantibiotic nukacin producers, strain ISK-1 previously labeled as *Pediococcus* sp. ISK-1 and strain Nagano, were characterized biochemically and genetically. Cells were spherical, 0.6 µm in size, and occurred in pairs. The strains were gram-positive, catalase positive and produced more than 75% of DL-lactic acid from glucose and their growth was stimulated by mevalonic acid. The strains tolerated 18% NaCl. G+C content was 36%. 16S rRNA homology revealed that the strains resembled *Staphylococcus warneri*. Both strains were confirmed by quantitative DNA-DNA hybridization to be variant strains of *S. warneri*. These strains have been deposited in the Japan Collection of Microorganism as *S. warneri* JCM 10004 for strain ISK-1 and *S. warneri* JCM 10005 for strain Nagano.

In the northern Kyushu area, many old aged *Nukadoko* (bed of fermented rice bran) have been maintained until now and some are believed to have lasted for a few hundred years (Kimura et al., 1997). *Nukadoko* is usually used for pickle fermentation using washed vegetables without any aseptic treatment. We

therefore suspected that *Nukadoko* must possess a native microflora control system that attacks undesirable microorganisms that comes into contact with the bed from the environment. We isolated two organisms, strain ISK-1 and strain Nagano, from an old aged bed owned by Mrs. Sato in Kitakyushu-shi, Japan, a cooking instructor for *Iwashino-Nukamisodaki* which is a local traditional Japanese cuisine, consisting of cooked sardine with old aged *Nukadoko*. These strains were isolated by the following procedure. One gram of *Nukadoko* was suspended in 10 ml of pure water and stood for 24 h at 30°C. One milliliter of the suspension was suspended in 100 ml of thioglycolate (TGC, Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) with 1.5% agar and 1.5% CaCO₃ to which NaN₃ 10 ppm and cycloheximide 10 ppm were supplemented. The agar plates were incubated in an anaerobic jar for 2 days. The organism was purified by repeating single colony isolation on TGC agar plate.

Strain ISK-1 and strain Nagano grew in both anaerobic and microaerophilic conditions. These strains were gram-positive cocci occurring in pairs, catalase positive, and produced more than 75% of DL-lactic acid from glucose with only a little amount of acetic acid. Lactic acid was determined in the form of L- and D- in-

* Address reprint requests to: Dr. Kenji Sonomoto, Faculty of Agriculture, Graduate School of Kyushu University, 6–10–1 Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka 812–8581, Japan.

Silicified Microbial Community at Steep Cone Hot Spring, Yellowstone National Park

FUMIO INAGAKI^{1*}, YOSHINOBU MOTOMURA², KATSUMI DOI¹, SACHIHIRO TAGUCHI³, EIJI IZAWA⁴, DONALD R. LOWE⁵ and SEIYA OGATA^{1**}

¹ *Microbial Genetics Division, Institute of Genetic Resources, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Higashi-ku, Fukuoka 812–8581, Japan*

² *Department of Earth and Planetary Sciences, Faculty of Science, Graduate School Kyushu University, Higashi-ku, Fukuoka 812–8581, Japan*

³ *Department of Earth System Science, Faculty of Science, Fukuoka University, Jounan-ku, Fukuoka 814–0180, Japan*

⁴ *Department of Mining, Faculty of Engineering, Kyushu University, Higashi-ku, Fukuoka 812–8581, Japan*

⁵ *Laboratory of Geological and Environmental Sciences, Stanford University, USA*

(Received December 11, 2000—Accepted April 11, 2001)

At Steep Cone hot spring, Lower Geyser Basin, Yellowstone National Park, a mound of siliceous deposits called “siliceous sinter” forms from discharged boiling geothermal water that is supersaturated with amorphous silica. Electron-probe microanalyzer (EPMA) observations suggested that silica is deposited on the surface of the cells and that microorganisms affect the formation of the siliceous sinter. EPMA signals and backscattered electron images of sinter samples taken at the inner wall of the boiling pool revealed framboidal pyrite structures associated with a network of silicified microbial structures. The structure of bacterial community in a beige-colored sinter sediment (75.8°C, pH 8.6) was studied by molecular clone type phylogenetic analysis of PCR-mediated 16S rDNA fragments. The bacterial rDNA clones found indicated the presence of a complex community in the sinter sediment. Sequences closely related to the genera *Thermus* and *Saccharomonospora* were dominated; evidence of indigenous microbial components.

Key words: geothermal water, bacterial community, Yellowstone National Park

Silicon, the second most abundant element of the earth's crust, is important not only as a major component of soil and rock but also as an essential element of animals, plants, and microorganisms. The presence of microorganism-like rod-shaped structures in geothermal and hydrothermal environments has been reported^{6,9,11,12,13,25}. Also, iron-silica crystallites associated with bacteria and their remains have been found in geothermal environments⁷. Results of electron microscopic observation of biomats from natural alkaline

lake water and hot springs have suggested that calcite and magnetite are precipitated on the surface of cyanobacteria or diatoms^{16,18,25}. Recently, several molecular studies on siliceous biomineralization in diatom and marine sponge have been reported^{5,8,14,15,19}. The cell wall of diatoms is composed of amorphous hydrated silica and organic components, and is called a frustulum. Kröger *et al.* reported that proteins associated with the siliceous cell wall, called frustulins, contain proline or glycine-rich domains^{14,15}. Hildebrand *et al.* reported the results of genetic analysis of a silicon transporter family in diatoms and that the silicon transporters are likely transmembrane proteins⁸. However, the microbial function and ecological impact on the siliceous mineralization in natural environments are not well understood yet.

** Corresponding author; E-mail: ogata@agu.kyushu-u.ac.jp, Tel & Fax: +81–92–642–3053

* Present address: Subground Animalcule Retrieval (SUGAR) Project, Frontier Research Program for Deep-Sea Environments, Japan Marine Science and Technology Center (JAMSTEC), Yokosuka 237–0061, Japan.

Disruption of the *hup* gene encoding a histone-like protein HSI and detection of HSI2 of *Streptomyces lividans*

Eiji Yokoyama^a, Katsumi Doi^a, Makoto Kimura^b, Seiya Ogata^{a*}

^aInstitute of Genetic Resources, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Higashi-ku, Fukuoka 812-8581, Japan

^bDepartment of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Higashi-ku, Fukuoka 812-8581, Japan

Received 16 February 2001; accepted 9 April 2001

Abstract – When the latter half of the *hup* gene encoding a histone-like protein HSI of *Streptomyces lividans* TK24 was replaced by the kanamycin resistance gene, the *hup* mutant EY1 grew slowly in liquid medium and this delay was overcome by introduction of the complete *hup*. EY1 sporulated normally on solid medium, with no serious defects as observed in *hupAB* mutants of *Escherichia coli*. Therefore, HSI probably has a role in growth in the presence of liquid medium and this organism may possess another histone-like protein with functions overlapping those of HSI. We cloned the *hup2* gene encoding another histone-like protein HSI2, which has two motifs of prokaryotic histone-like protein and eukaryotic histone H1. The amount of HSI2 increased in EY1, determined by western blotting analysis using an anti-His-tagged HSI2 polyclonal antibody. We are entertaining the notion that the increased amount of HSI2 partially suppressed the defects caused by the *hup* mutation. © 2001 Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS

CspA / histone H1 / histone-like protein / HU protein / *Streptomyces*

1. Introduction

Streptomyces strains have linear chromosomes of about 8 Mb [15] and develop multinucleoidal mycelia to uninucleoidal spores. Factors involved in the maintenance of chromosome structure, DNA replication and segregation have been studied. The bacterial histone-like protein HU has roles in DNA-protein interactions such as DNA condensation [18] and replication [4]. A relationship between HU, MukB and MinCDE has been reported [11].

We earlier cloned the *hup* gene encoding the histone-like protein HSI (histone-like protein of *Streptomyces lividans*) [29]. The present work deals with disruption of *hup* and cloning of *hup2* encoding a newly identified histone-like protein HSI2 in *S. lividans* TK24. Western blot analysis using an anti-His-tagged HSI2 pAb was also done.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains, plasmids and media

Streptomyces lividans TK24 [6] was the parental strain used to construct *hup* mutants. pANT3-1 [7] and pIJ702 [13] served as sources of the *Mlu*I fragment carrying the kanamycin resistance gene *kan* [9] and the *Bcl*I fragment carrying the tyrosinase gene *mel*, respectively. pRES18 [10] was a low-copy shuttle vector. *S. lividans* strains were grown at 28 °C in TSB medium [6] supplemented with 10.3% sucrose or on rye flakes medium [19]. Kanamycin and thiostrepton were added to final concentrations of 50 and 20 µg/mL as required, respectively.

Escherichia coli JM109 [26] and pUC18 [26] were used in the general cloning. When plasmid DNA propagated in *E. coli* was to be introduced into *Streptomyces*, methylation-deficient *E. coli* ET12567 (*dam*⁻, *dcm*⁻, *hsdM*⁻) [16] was used. *E. coli* BL21-(DE3)pLysS (Stratagene) and pET-16b (Stratagene) were used in preparation of His-tagged HSI2. *E. coli* strains were grown at 37 °C in LB medium [22], and as needed, ampicillin was added to achieve a final concentration of 50 µg/mL.

* Correspondence and reprints.

E-mail address: ogata@agr.kyushu-u.ac.jp (S. Ogata).

Biological and Molecular Investigations of Spontaneously Developing Pocks in *Streptomyces*

Seiya Ogata

Microbial Genetic Division, Institute of Genetic Resources, Faculty of Agriculture, Graduate School, Kyushu University, Fukuoka 812-8581, Japan
Phone and Fax: +81-92-642-3053. E-mail: ogata@agr.kyushu-u.ac.jp

1. INTRODUCTION

Some antibiotic-producing *Streptomyces* species form unique colonies or lawns with spontaneously developing pocks (S pocks) in solid culture. These pocks appear during the growth of the organisms, and increase in number with repeated transplantations on solid media. Spore formation and typical aerial hyphae formation are never observed in the pocks. The appearance of S pocks results in serious damage to the preservation of bacterial strains and the fermentation process, as the spores are used as a starter for the fermentation industries.

This phenomenon had been designated as “unknown physical phenomenon”, but was known as “lethal zygotis” or “pocks” in the cases of *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces lividans* and some others^{2, 3, 4, 9)}, in which conjugative plasmids and their transfer are involved in lethal zygotis. The pocks are characterized by circular zones of retarded development of the plasmid-accepted hyphae (transconjugants), when the donor strain develops within the lawn of the recipient strain (plasmidless or plasmid-cured strain)^{2, 3, 4, 9, 12, 16, 29)}. Much interest has focused on suppression of aerial mycelial growth and sporulation by conjugative plasmids in several *Streptomyces* species^{8, 9, 15, 16, 17)}. In this report, these pocks are termed conjugative pocks (C pocks).

There are distinct differences between the formation of C pocks and that of S pocks: the former requires two types of strains, a donor and a recipient for the conjugative plasmid transfer, whereas the latter occurs in a homotype strain which originates from a single spore. These differences afforded the opportunity to study S pocks. Conjugative plasmids also seem to elicit the formation of S pocks in their host mycelia in solid culture.

The S pocks were first reported for the thiostrepton-producing *Streptomyces azureus* ATCC14921²⁷⁾ and then in *Streptomyces endus* KCCS-0213 (*Streptomyces hygrosopicus* JCM4213)²⁴⁾. The words “spontaneously developing plaques” were first used in the former, and then were changed to “spontaneously developing pocks” in the latter¹⁴⁾, owing to C pocks. Similar observations of S pocks have been noted in several species of *Streptomyces*^{21, 25, 26)}. In the S pocks, lysis of aerial and sporulating hyphae is observed accompanying production of a large number of defective phage particles. However, neither the lysis nor the phage particle production occurs in the substrate or submerged hyphae. The S pock-forming phenomenon

seems to be closely related to morphological differentiation.

I review here the nature of S pocks in thiostrepton-producing *S. azureus* ATCC14921 (wild-type strain PK0) and *Streptomyces laurentii* ATCC31255 (wild-type strain P0), together with control measures against the appearance of S pocks and the properties of conjugative plasmids. Mechanisms related to formation of S pocks will be discussed and comparisons with C pocks made.

2. CHARACTERISTICS OF SPONTANEOUSLY DEVELOPING POCKS (S POCKS)

Plate (or slope) cultures often show spontaneously developing pocks during serial subcultures of normal (healthy) cultures. In Fig. 1, giant subcultured colonies were used. The number of S pocks in the abnormal (eroded) colonies increased with repeated transplantations. Inhibition of spore formation and aerial mycelial growth was seen in the pocks. UV-irradiation stimulated pock formation. Ultimately, almost all eroded colonies had few aerial mycelia and no spores, whereas growth of substrate mycelia continued.

Infectious activities of eroded colonies were determined in the overlapping invasion test and stamp test, as shown at the bottom of Fig. 1. The eroded colonies invaded the normal colonies and inhibited their growth. In the invaded area and on the borderline, pocks developed. The stamped area formed a zone of inhibition in growth of aerial mycelium and sporulating hypha. Thus, S pocks have infectious activities or certain factors.

In the S pocks of *S. azureus* and other species^{21, 24–27)}, lysis of aerial and sporulating hyphae was observed accompanying production of a large number of defective phage particles or phage-like particles. However, neither the substrate nor submerged hyphae were lysed. Factors related to the lysis will also be given attention.

3. CONTROL MEASURES AGAINST THE APPEARANCE OF SPONTANEOUSLY DEVELOPING POCKS (S POCKS)

The eroded cultures were readily restored to normal conditions once they were passed through liquid cultures under shaking conditions, as follows (Fig. 2)^{14, 16, 24, 27)}. The spores or mycelia (or both) of the eroded solid cultures were inoculated into the broth for over 24 hr, under

Heat resistance and local structure of FeCl₂-absorbed crosslinked poly(γ -glutamic acid)

T. Nishida,^{1*} H. Kamezawa,² T. Hara,³ Y. Matsumoto⁴

¹ Department of Biological and Environmental Chemistry, Kyushu School of Engineering, Kinki University, Kayanomori 11-6, Izuka 820-8555, Japan

² Department of Chemistry, Faculty of Science, Kyushu University, Hakozaki 6-10-1, Fukuoka 812-8581, Japan

³ Division of Applied Genetic Resources, Department of Genetic Resources Technology, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Hakozaki 6-10-1, Fukuoka 812-8555, Japan

⁴ Department of Electrical Engineering, Faculty of Engineering, Fukuoka University, Nanakuma 8-19-1, Fukuoka 814-0180, Japan

(Received June 22, 2001)

Fiber of Japanese food natto (*Bacillus subtilis*) is known to be superabsorbent poly(γ -glutamic acid) (PGA). NaCl particles precipitate in FeCl₂-absorbed crosslinked PGA when heated at crystallization temperature of 320 °C for 10 to 60 min. After heat treatment the Mössbauer spectrum of FeCl₂-crosslinked PGA consists of a quadrupole doublet due to FeCl₂·2H₂O. The Mössbauer spectrum of anhydrous FeCl₂ reagent heated under the same condition shows an intense sextet due to α -Fe₂O₃. These results prove that the superabsorbent polymer, crosslinked PGA, has higher heat resistance.

Introduction

It is generally known that poly(γ -glutamic acid), PGA, constitutes the fiber of natto (*Bacillus subtilis*), which is a popular Japanese food prepared by the fermentation of soybeans. It is also known that the fiber of natto is a biodegradable plastic or biopolymer, in which γ -carboxyl groups are bonded to amino groups to form γ -amido bonding. It was reported that crosslinked PGA is a superabsorbent, e.g., 1 g of crosslinked PGA prepared by the gamma-ray irradiation with ⁶⁰Co source can absorb 5 l of water.¹ Biodegradable superabsorbent polymer has several potential applications for the environmental purification like sewage purification, change of the waste into the compost, green-land project of dessert, etc.¹

Mössbauer spectroscopy becomes a powerful tool for characterizing local structure, nature of the chemical bond, electronic structure and magnetic properties of solid materials.^{2,3} Mössbauer studies of several functional glasses, like electrical conducting^{4,5} and IR-transmitting glasses^{6–8} revealed the structural role of Mössbauer atoms, mechanism of crystallization and the relationship between local structure and physical properties. Mössbauer spectroscopy is also useful for the characterization of new nuclear waste⁹ and heavy metal waste glasses.¹⁰ The present study was carried out in order to elucidate the local structure and thermal properties of crosslinked PGA in which FeCl₂ was absorbed for characterizing crosslinked PGA by means of Mössbauer spectroscopy.

Experimental

Crosslinked PGA was prepared by ⁶⁰Co- γ -ray irradiation (20 kGy; 1.2 kGy·h⁻¹) of PGA of guaranteed reagent grade, having the D-Glu/L-Glu ratio of 6:4. An aqueous solution of FeCl₂ was prepared of commercially available reagent of guaranteed grade (36 mg) and distilled water (1 ml). The FeCl₂ solution was mixed with ten times amount (360 mg) of crosslinked PGA. As a result, yellow paste of crosslinked PGA containing FeCl₂ was prepared. Heat treatment of the FeCl₂-crosslinked PGA was carried out in air for 1 to 60 minutes in an electric muffle furnace. Crystallization temperature (T_c) was determined by differential thermal analysis (DTA) conducted at heating rate (α) of 10 min⁻¹, using powdered α -Al₂O₃ as the standard. FT-IR spectra were recorded by the conventional KBr disk method. Mössbauer spectra were recorded by the constant acceleration method with a ⁵⁷Co(Pd) source of 3.7·10⁸ Bq and a reference of α -Fe foil enriched with ⁵⁷Fe, which was also used for calibrating the velocity of the spectrometer (abscissa of the spectrum). X-ray diffraction pattern of crosslinked PGA was recorded at scanning rate of 0.5°·min⁻¹ with a source of Cu K α rays. Each sample was placed in a polyethylene bag during the Mössbauer and XRD measurements.

Results and discussion

Glass transition temperature (T_g) and T_c of crosslinked PGA were determined by DTA, as illustrated in Fig. 1. Endothermic peak observed at around 200 °C

* E-mail: nishida@fuk.kindai.ac.jp

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. 2 (2001)

クワコの自然集団中に見出された "くわかかすり変異体"の遺伝解析

中村 隆*・伴野 豊**・藤井 博**

*九州大学大学院生物資源環境科学府

**九州大学大学院農学研究院

カイコの祖先種とされているクワコ (*Bombyx mandarina*) の正常な幼虫体色は暗褐色である。ところがクワコの自然集団中に、カイコのかすり変異体と類似した模様をもつ個体が、長野県南安曇野郡と福岡県宗像郡玄海町において、それぞれ1頭ずつ発見された。そこでこれら野外のクワコに見出されたかすり様変異体 (仮称: くわかかすり) の遺伝的性質を明らかにすることを目的に分析を行った。

くわかかすりとカイコ e03 系統とを交配した F_1 では皮膚形質はすべて正常であった。さらに F_1 雌にカイコ雄を戻し交配した BF_1 の相互交配区 B_1F_2 における形質分離を調査したところ、4 蛾区合計で正常個体が354頭、かすり個体が92頭分離した。この分離比から、くわかかすりは一劣性遺伝子により支配されていると判断された。そこで本突然変異体をくわかかすり (遺伝子記号: q^m) と命名した。次に qw 遺伝子とカイコのかすり遺伝子 (q) との関係を明らかにするために、くわかかすり個体 (q^m/q^m) とカイコのかすり個体 (q/q) との交配実験を行った。その結果、後代すべての個体がかすりとなったことから、 q^m 遺伝子と q 遺伝子とは対立遺伝子であると

日本産クワコとカイコ染色体数の違いには 第14連関群染色体が関与する

伴野 豊^{*}・中村 隆^{**}・藤井 博^{*}・土井良 宏^{*}・長島栄一^{***}

^{*}九州大学大学院農学研究院

^{**}九州大学大学院生物資源環境科学府

^{***}信州大学繊維学部

日本産クワコの染色体数はカイコおよび中国、極東ロシア、台湾内に生息するクワコの染色体数 $n=28$ に比べ一本少ない $n=27$ である。日本産クワコとカイコとの交雑 F_1 個体では第一減数分裂期に26本の2価染色体と1本の3価染色体からなる $26\text{II} + 1\text{III}$ の染色体構成が観察されることから、日本産クワコにはカイコの2本の染色体が融合した染色体が1本存在することが予想されていた。20年以上にわたりカイコのいかなる2本の染色体がこの融合染色体に対応するのか遺伝学的ならびに細胞遺伝学的に追求してきた結果、カイコの第14連関群染色体がクワコ融合染色体に関与していることが明らかとなったので報告する。

実験に用いたクワコは福岡市、宗像郡玄海町、糸島郡志摩町、長野県南安曇郡（豊科町、堀金村、穂高町）、上田市において採集した。カイコは九州大学、信州大学に維持される系統を用いた。まず、クワコと各連関群の標識遺伝子をもつカイコとを交配し F_1 を得た。この F_1 雌に対象とする標識遺伝子が劣性の場合には標識遺伝子系統のカイコ雄を、優性の場合には正常形質を持つカイコ雄個体を戻し交配した。 BF_1 に分離した標識形質個体と正常形質個体の染色体数の分離を観察した。

第一減数分裂中期に $26\text{II} + 1\text{III}$ と 28II の染色体構成が標識形質個体と正常形質個体で共に確認された場合は当該遺伝子の所属する連関群は融合染色体とは独立である。一方、標識形質個体では全ての個体で 28II の染色体構成、正常形質個体では全てが $26\text{II} + 1\text{III}$ の染色体構成となった場合は、同連関群が融合染色体に関与していると判定される。調査した既存の27連関群のうち26連関群とは独立であった。ところが、第14連関群に関して U 遺伝子を標識遺伝子として解析した場合、 BF_1 で分離した U 個体は全て 28II の染色体構成であったのに対し、 $+$ 個体は全てが $26\text{II} + 1\text{III}$ の染色体構成であり、第14連関群染色体がクワコの融合染色体に関係していることが明瞭に認められた。

カイコの形質連鎖地図と分子遺伝子地図との統合 —第3報—

西坂 章文*・野田 真路**・田村 圭*・江口 誠一*・西川 和弘*・
中村 隆*・伴野 豊*・古賀 克己*・藤井 博*・原 和二郎***

*九州大学大学院農学研究院

**九州大学大学院生物資源環境科学府

***独立行政法人農業生物資源研究所

独立行政法人農業生物資源研究所ではEST化したcDNAクローンを用いたカイコの分子遺伝子地図作成が行なわれている。現在までに、カイコの染色体数 $n = 28$ に相当する28群からなるcDNAクローン連鎖地図が出来上がっている。このcDNAクローン連鎖地図と突然変異体を主対象として構築されている形質連鎖地図との対応関係について究明中である。

今回、形質連鎖地図の第16連鎖群が分子遺伝子地図の第2連鎖群と対応していることが新たに判明した。九州大学大学院農学研究院遺伝子資源開発研究センターの保存系統で、形質連鎖地図の第16連鎖群の標識遺伝子 cts 褐頭尾斑をもつw41系統雌にp50系統雄を交配、得られたF1にw41系統雄を戻し交配した。このBF1では正常形質個体(+/ cts)と cts 個体とが1 : 1の比で分離した。各々5個体ずつから、形質別に分け5齢熟蚕期に後部絹糸腺からゲノムDNAを抽出した。ゲノムDNAを制限酵素HindIIIで消化処理し、0.7%アガロースゲルで電気泳動した。メンブレンに転写し、cDNAクローン連鎖地図上第2連鎖群に属すcDNAプローブm187を用いて、サザンハイブリダイゼーションを行った。その結果、正常形質個体では5個体すべてにおいて約9.5kbpと8kbpの2本のバンドを認めた。一方、 cts 個体では5個体すべてにおいて約9.5kbpの1本のバンドが検出された。カイコでは雌で組換えが起きず完全連鎖である。したがって、分子遺伝子地図の第2連鎖群は形質連鎖地図の第16連鎖群に対応していることになる。

カイコ体液Kunitz型キモトリプシンインヒビターの ゲノム構造解析

何寧佳*・上野由宣**・藤井 博*・伴野 豊*

*九州大学大学院農学研究院

**九州大学大学院生物資源環境科学府

カイコ幼虫体液中のKunitz型キモトリプシンインヒビターは*Ict-H*、*Ict-A*、*Ict-B*遺伝子および新たに見い出した遺伝子によって支配され、これらの遺伝子は第2連関群の23.7に座することが明らかにされている。そこで、各遺伝子のゲノム上での配列および転写調節領域の構造を明らかにするためにp50系統(CI-13とCI-b1)を用いてゲノムの構造の解析を試みた。その結果、signal peptide領域を含む261bpのCI-13 cDNAと258bpのCI-b1 cDNAをクローニングし、それらの塩基配列を明らかにした。

この配列に基づきプライマーを合成し、ゲノム解析を行ったところ、これまでCI-13遺伝子は1箇所であるといわれていたが、ゲノム上に2箇所存在することを認めた。さらに、1.8kbと0.8kb断片中には3個のエキソンからなる同じ大きさの遺伝子が存在した。しかしながら、1.8kb DNA断片中のイントロン1と2の大きさは0.8kbのものよりも大きかった。1.8kb断片中のイントロン1と2にはカイコgypsy-Ty3-like retrotransposable elementsの一部の配列に95%の相当性をもつ配列が1箇所ずつ存在した。しかし、0.8kb断片中には認められなかった。また、1.8kb断片中のイントロン2には、1には存在しないリピート配列が認められた。さらに、1.8kb断片と0.8kb断片の関係を見ると、1.8kbの3'側に0.2kb断片を介して0.8kb断片が繋がっていた。

カイコ幼虫中腸の組織崩壊にともない発現する体液 キモトリプシンインヒビター8レセプターの 同定および精製

上野由宣* 何寧佳** 伴野 豊** 藤井 博**

*九州大学大学院生物資源環境科学府

**九州大学大学院農学研究院

完全変態昆虫の変態機構の解明は、組織の構築、維持、改変の研究モデルとして幅広い情報を提供すると考えられる。カイコの体液キモトリプシンインヒビター8 (CI-8) は組織崩壊が進行している中腸および脂肪体へ時期特異的に取り込まれる。このことから、CI-8 はこれらの組織でプロテアーゼ阻害などの作用をおよぼして、組織崩壊に何らかの役割を担うと考えられる。本研究では中腸の組織崩壊におけるCI-8の機能の解明を目指し、最初のステップとして、組織崩壊に関わると考えられるCI-8に対するレセプターおよび細胞質タンパク質の同定をファーウエスタン法で行った。

リガンドとしてCI-8を利用するためにCI-8を体液より精製し、精製CI-8をピオチン化標識した。他方、レセプターが存在していると考えられる成熟幼虫中腸の細胞分画を行い、膜分画を抽出し、これを界面活性剤で可溶化した。可溶化タンパク質はSDS-PAGE後ニトロセルロース膜に転写した。リガンドと膜タンパク質の相互作用は西洋わさびパーオキシダーゼとECLにより検出した。この結果、CI-8と直接相互作用するタンパク質として60KDaおよび29KDaのタンパク質を検出した。さらに、60KDaタンパク質はCI-8固相化アフィニティクロマトグラフィーにより精製を行った。その結果、60KDaタンパク質はSDS-PAGE後の銀染色により単一バンドとして精製された。現在、60KDaタンパク質の大量調整を行い、クローニングのためのアミノ酸情報の取得を目指している。

特集

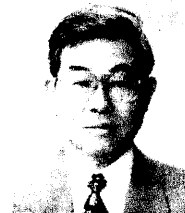
現代の乳酸菌研究を斬る

—特集によせて—

「ヒトに優しく、地球に優しい」

乳酸菌研究の新世紀

緒方靖哉



21世紀を迎え、我々人類の生活は豊かにかつ便利になる一方、豊かさをもたらす環境破壊、豊富な食生活あるいは慢性的に運動不足から来る生活習慣病、清浄な環境が整備されているにもかかわらずO-157やMRSA、VREなどさまざまな病原性菌の大発生など難題が山積している。近年、このような難問解決の場で乳酸菌に関連した話題、ニュースを頻繁に見聞きする。元来、乳酸菌は古代アラビアにおいてすでに食品生産に利用されていたように、古来より人類との関係が強い有用微生物であった。我が国においても、中国より伝来した乳酸発酵食品である「醃酏」が貴族の間で食され、「醃酏味」の語源となったとされている他、なれ鮎、漬け物、清酒をはじめ多くの食品製造分野で伝統的に使用されてきた。近年、発酵工学、遺伝子工学の急激な進歩は、伝統的食品製造に限って機能を発揮してきた乳酸菌に潜在能力を顕化させると共に、新たな使命を持たせるようになってきている。また、乳酸菌発酵産業が伝統的に盛んなヨーロッパ各国では、乳酸菌が生み出すさまざまな抗菌物質はGRAS (Generally Recognized As Safe) な食品添加剤として盛んに利用されはじめ、食品保蔵における「バイオペリザベーション」(biopreservation) 効果に衆目が集まっている。また、これまでは欧米各国が中心となって推進されてきた乳酸菌の基礎研究と実用化であるが、日本を始めアジア各国においてもさまざまな乳酸発酵産品が見いだされる。特に、アジアは、その気候などの環境の多様さゆえ、新世紀の乳酸菌遺伝子資源の有望なソースとなりうる可能性を秘めている。「乳酸菌は人類が21世紀に積み残した問題を解決する救世主となりうるのか？」これが本特集が提言する主題の一つである。

乳酸菌は古来より継続して利用されてきた菌群であり、ヒトの健康に有効であることは経験的に知られていたが、腸管常在性や酸耐性、バクテリオシンを代表とする有用産物生産特性などの精緻な解明は行われていなかった。健康志向ブームとも相まって乳酸菌の特定保健用食品が開発されると共に“antibiotics”に対応した“probiotics”(プロバイオティクス) という言葉も広く認知されつつある近年、乳酸菌における生化学および分子生物学的研究は急速な勢いで進展しており、菌体構造・菌体成分、代謝生理、有用物質の生産性など、あらゆる面において新たな発見が成されている。これらはあたかも「乳酸菌科学」とも言うべきものであろう。特に、腸管内での接着性やプロバイオティクス能に関与する性質、菌体構成成分などについての分子レベルでの詳細な解明が進展している。

このような乳酸菌ライフサイエンス研究の進展と両輪を成すように、乳酸菌を用いた発酵生産技術の開発と展開にも目を見張るものがある。炭酸ガスによる地球温暖化やゴミによる環境破壊など地球環境保全は人類の重要課題の一つであるが、乳酸発酵では炭酸ガスの発生がほとんどなく、また低い菌体濃度ではほぼ100%に近い乳酸転換率が得られる。省資源、省エネルギーで炭酸ガス発生のない理想的なバイオプロセスであると見なされている。また、ポリ乳酸は生分解性樹脂の一つとして知られ、地球環境問題の根本的な解決やグリーンケミストリーの理念を実現できる可能性を秘めている。さらに、その生産に未利用バイオマスをを用いることで、省資源・生産の低コスト化の実現が期待されている。

一方、このような乳酸菌の生命情報の集積と生産技術

著者紹介 九州大学大学院 農学研究院 遺伝子資源工学部門(教授)、遺伝子資源開発研究センター(併任・センター長)

〒812-8581 福岡市東区箱崎6-10-1 TEL. & FAX. 092-642-3053

E-mail: ogata@agr.kyushu-u.ac.jp

受賞総説

新規微生物現象の解明と応用に関する研究

(2001年度農芸化学会功績賞受賞)

緒方靖哉

(九州大学大学院農学研究院遺伝子資源工学部門)

Key words: bacteriophage control; bacterial lysis; pock formation; spore formation; bio-deposition of silica

発酵などの産業にとって、生産に支障を来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、現実に生産異常をもたらした未解明の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。本稿は、これらの経緯や結果を下記の4項にまとめたものである。しかし、記述内容が雑ばくなるのは否めないで、関連する文献を挙げておいた。ご参照いただければ幸いである。

1. ファージ汚染と防除対策に関する研究

バクテリオファージ（以下ファージ）の汚染はさまざまな発酵産業の生産プロセスで発生し、しばしば多大な被害をもたらしてきた^{1)~4)}。しかし、今日、ファージ汚染の問題は近代設備と施設を有する企業では、予防対策を中心とする有効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^{1)~4)}。一方、チーズ、乳酸飲料、ワイン、醤油などの原料の殺菌を十分に行えない発酵や開放系の発酵ではファージ汚染を免れるのは難しく、ファージ汚染はなお大きな問題である。増産に伴う工場の拡張工事の際には、雑菌汚染と同じくファージ汚染の危険性が非常に高くなる。また、遺伝子操作で育種した大腸菌などの単一種・株を使用している発酵では重大な汚染に陥りやすい。有効な汚染対策の開発を目指した研究は今日も重要な課題になっている⁵⁾。

筆者らは、アセトン・ブタノール発酵、アミノ酸発酵、乳酸菌利用発酵などのファージ汚染を系統的に追究し、発酵タンクに侵入したファージの多くは、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を明らかにするとともに、発

酵環境の整備を中心とした汚染対策を提示した^{1)~4)}。さらに、活性汚泥の浄化機能低下^{4)~6)}と西南暖地型サイレージの発酵品質低下^{7)~9)}の要因に、ファージ感染による優占菌種・株の死滅と続く他菌種・株への交代がかかわっていることを見だし、多種多様の菌種・株が活動している環境でのファージ発生と汚染状況を明らかにした。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とを示した。これらのファージ発生による菌種・株交代現象の知見に加えて、人為的に特定の菌株を土壌にばらまき続けた場合に、該菌株に感染するファージが短期間のうちに出現することを実証して^{4), 10)}、自然界における菌群の変動に及ぼすファージのかかわりの重要性を推断した。

ファージの感染は、まず細胞表層のレセプターへの吸着、つづく細胞内へのファージゲノムの侵入、さらにファージゲノムの複製とファージ構成タンパク質の合成、ファージ粒子の構築、溶菌過程を経て、娘ファージが細胞外への放出されるステップからなる (Fig. 1(A))¹¹⁾。ファージ感染の各ステップで対応する細菌側の防御機能があり、感染を阻止するが、ファージ側もこれらの細菌の生体防御に対して実に巧妙な対抗手段をとって感染に成功する^{5), 12)}。従来からファージ汚染に対しては、細胞表層にあるファージレセプターに変化の生じたファージ耐性株 (bacteriophage-insensitive mutant strains, BIMS) が利用されている。多くの乳酸菌利用発酵では、前述の特殊性からファージ系列の異なる複数のBIMSや複数の別種・株を用意し、ローテーションを組んで使用する方法 (phage defense rotation strategy) によって、ファージ汚染を主に回避してきた^{5), 11)}。近年、細菌の有するあらゆるファージ耐性機能を相互に利用して、積極的にファージ汚染に立ち向かおうとする研究が乳酸菌利用発酵分野で展開されている。特に、ファージ増殖を阻害するプラスミドの利用の有効性が指摘され、注目を集めている⁵⁾。その多くはプラスミド支配の制限酵素や不稔感染 (abortive infection, Abi 機構) の要因になる Abi タンパク質を利用する研究である。

サイレージ乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* NGRI0101 株はファージ耐性に作用するプラスミド pLKS を有してい

Novel microbial phenomena and functions: Mechanisms and application

Seiya OGATA (Department of Genetic Resources Technology, Faculty of Agriculture, Graduate School, Kyushu University)

受賞講演2 新規微生物現象の解明と応用に関する研究

緒方靖哉 (九州大学大学院 農学研究院 遺伝子資源工学部門)

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、新規の或いは特異性のある有用な微生物機能も見出さる。本研究では、下記の、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、さらに得られた成果を、生産への対応策のみならず基礎並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

種々の発酵生産プロセスにおける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、7編の国内外の著書（発酵と微生物 II, p1-108; The microbial production of amino acid, Kodansha Ltd. and John Wiley & Sons, p67-90; *Adv. Appl. Microbiol.*, Vol.25, Academic Press, p177-193 等）及び総説（*Biotechnol. Bioengin.*, 22Suppl.1, 177-193, 1980; ウィルス, 50, 17-26, 2000等）に纏めることができた。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自負している。さらに、ファージ汚染の防止が難しい、原料の殺菌が行えない発酵或いは開放系の発酵について追究し、ファージ感染を抑制する遺伝子をファージ耐性プラスミドに見出し、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。この間、ファージのコードする溶菌酵素 (endolysin) をはじめとするファージとプラスミド機能の利用開発を計った。

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 (0.2~0.5Mのショ糖やNaCl等) 中で、溶菌が起こる現象を *Clostridium* 属細菌で追究して、溶菌に及ぼす autolysin の作用機作や細胞壁・細胞膜の構造を解明した。さらに、本成果をプロトプラスト形質転換法やDNA分離法へ活用するとともに、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の細胞表層の機能に関する重要な知見の発見に繋げた。

3. 放線菌の形態分化異常に関する研究

Streptomyces 属放線菌には胞子の欠失した菌叢を生じる進行性の異常現象 (自然誘発性 pock 形成現象) が普遍的に見られる。その発生は、胞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 *S. azureus* や *S. laurentii* 等を用いて究明し、さらに本 pock 発生対策法を提示した。この間、本現象に関わる接合性プラスミド上の全遺伝子をはじめ、プラスミドの複製中間体の 1 本鎖 DNA に結合する 2 種類のヒストン様タンパク質とそれらの遺伝子、形態分化の異常に関わる遺伝子及び形態分化促進化合物などを明らかにした。

4. 好熱菌のシリカ鉱物形成促進作用

シリカ鉱物は地熱水湧出地帯で産出されるが、地熱発電所の熱水を循環させるパイプライン等の設備にも短期間に多量沈着し、発電に支障をきたしている。シリカ鉱物の形成過程と環境ゲノムの相関を解析し、好熱菌が、熱水に溶存しているシリカの急速な鉱物化に関与することをはじめて明らかにした。さらに、本生成反応に重要な作用をしていると推測される約 35kDa のシリカ誘導性表層タンパク質の顕著な産生を見出し、その性状を究明した。

A Novel Cell-Free Translation/Glycosylation System

Toshio Hara

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

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

[Abstract]

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.

1. Introduction

A number of cell-free protein-synthesis systems have been prepared from rabbit reticulocytes, wheat germ, *Escherichia coli*, 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. 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

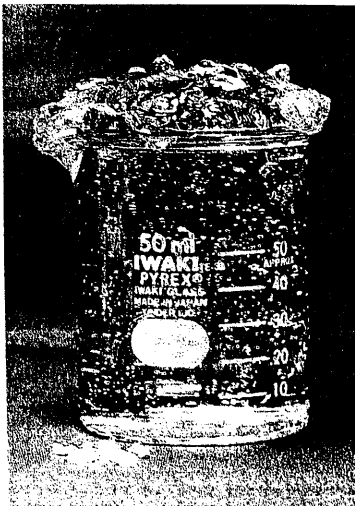
納豆の糸から納豆樹脂の開発とその利用

九州大学大学院農学研究院助教授

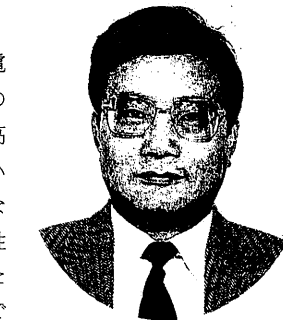
農学博士 原 敏 夫

1. はじめに

高吸水性樹脂はイオン性基を持つ電解質ポリマーをわざわざに架橋したもので、自重の数百倍から1,000倍という高い吸水性と、水を吸収して膨潤したハイドロゲルは圧力をかけても離水しない保水性を持つ材料である。高吸水性樹脂は、1960年代に米国で開発された機能性高分子材料の一つで、わが国では1976年に本格的に工業化されたのが始まりで、現在、紙おむつの他、医療、食品、園芸、建築など多くの分野で利用されている。このような高吸水性樹脂の中、アクリル酸系樹脂は自重の1,000倍の吸水能力を有し、安価であるため広く用いられているが、生分解性がほとんどなく、地下水汚染など環境への二次汚染の影響が危惧されている。



納豆の糸の成分、PGAに放射線照射して合成した納豆樹脂（左手前）と吸水後のハイドロゲル（ビーカーの中）



安価であるため広く用いられているが、生分解性がほとんどなく、地下水汚染など環境への二次汚染の影響が危惧されている。

納豆菌が生産する γ -ポリグルタミン酸 (Poly(γ -glutamic acid), PGA と略記) はグ

ルタミン酸が γ 結合し、重合度が5,000以上ある生分解性ポリアミノ酸で、 α 位のカルボキシル基が削除されるとナイロン4と同じ構造をとる。このPGA水溶液に放射線を照射するとPGA分子間で架橋反応を起こしPGA架橋体、いわゆる納豆樹脂が合成できる。この納豆樹脂は自重の5,000倍の水を吸収し、生分解性と可塑性を有するため、新たな機能性素材としての応用

が期待されている(カット写真)。納豆菌との出会いは20年以上前に遡るが、ここでは、納豆菌が生産するPGAから納豆樹脂の合成とその特性を利用した応用例を紹介する。

2. 納豆菌による γ -ポリグルタミン酸の生産

PGAは1937年に炭疽菌 (*Bacillus anthracis*) の來膜成分として Ivanovics¹⁾により発見され、Bovarnick²⁾により枯草菌の培養液中に発酵生産物として蓄積されることが認められた。すなわち、*Bacillus* 属のある種の細菌は、その表層の最外層にD-グルタミン酸、あるいはD, Lグルタミン酸が γ -グルタミル結合した高分子物質PGAを來膜 (capsule) あるいは粘質物質として生産する。このPGAを菌体外に分泌生産する *Bacillus* 属細菌として、炭疽菌や納豆菌を含む一部の枯草菌及びその類縁菌である *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. polyglutamicum* などが知られている (表1)。

一方、わが国の伝統的発酵食品である納豆の粘質物中にもPGAが含まれることが明らかになり、納豆ではその熟成につれてD型グルタミン酸の割合が80%以上に達する。PGAは納豆と一緒に摂取され



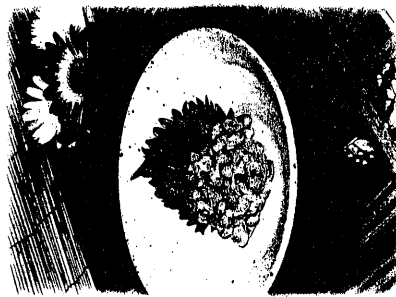
納豆樹脂の分子設計と機能化

-納豆の新たな有用性へ迫る-

我が国の伝統的な発酵食品(納豆)は、なじみの深い食品。納豆の持つ様々な機能が健康志向として強い人気を惹き、近年では、バイオ技術による品種改良(遺伝子組み換え)など、話題になってきている。一方、食品としてだけでなく、化粧品などの分野で使われていないかという疑問をもち、研究者が分子設計と機能化の研究を進めている。納豆の樹脂は、その有用性を九州大学の中で探求してみたい。

納豆発酵過程における納豆キナーゼ分解測定法の確立

原 敏夫



原 敏夫



実験結果の一部

本研究では、トランス脂肪酸の含有率を低く抑える納豆の製造方法を検討している。トランス脂肪酸は、LDLコレステロールを増加させるため、動脈硬化の原因となる。本研究では、トランス脂肪酸の含有率を低く抑える納豆の製造方法を検討している。トランス脂肪酸の含有率を低く抑える納豆の製造方法を検討している。トランス脂肪酸の含有率を低く抑える納豆の製造方法を検討している。

新たな納豆の系をつくる

"遺伝子"を採求...

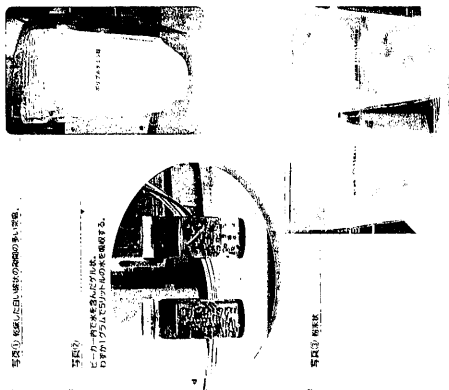
本研究では、納豆の"系"を改良し、納豆の系を新しく開発している。納豆の系とは、大豆の品種、大豆の処理方法、発酵条件などによって決まる。本研究では、大豆の品種、大豆の処理方法、発酵条件などを改良し、新たな納豆の系を開発している。納豆の系を開発することで、納豆の品質を向上させ、新たな用途を開拓することができる。

今、納豆の系を開発し、納豆の系を開発している。納豆の系を開発することで、納豆の品質を向上させ、新たな用途を開拓することができる。



原 敏夫
九州大学工学部
助教授

「樹脂の分子設計と機能化」 -納豆の系から新しい機能を発見する-



大豆の系を開発し、納豆の系を開発している。納豆の系を開発することで、納豆の品質を向上させ、新たな用途を開拓することができる。

原 敏夫

原 敏夫

大豆の系を開発し、納豆の系を開発している。納豆の系を開発することで、納豆の品質を向上させ、新たな用途を開拓することができる。

大豆の系を開発し、納豆の系を開発している。納豆の系を開発することで、納豆の品質を向上させ、新たな用途を開拓することができる。

大豆の系を開発し、納豆の系を開発している。納豆の系を開発することで、納豆の品質を向上させ、新たな用途を開拓することができる。

大豆の系を開発し、納豆の系を開発している。納豆の系を開発することで、納豆の品質を向上させ、新たな用途を開拓することができる。

納豆樹脂の特長とメリット

納豆樹脂は、大豆の系を開発し、納豆の系を開発している。納豆の系を開発することで、納豆の品質を向上させ、新たな用途を開拓することができる。

最前線技術レポート③⑧

納豆樹脂の開発と緑化への取り組み



編集部より

今回は、新たな緑化資材として注目を集めつつある「納豆樹脂」について、研究の最前線で取り組まれている九州大学 原助教にご寄稿いただきました。

九州大学大学院農学研究院 遺伝子資源開発研究センター・助教 原 敏夫

●はじめに

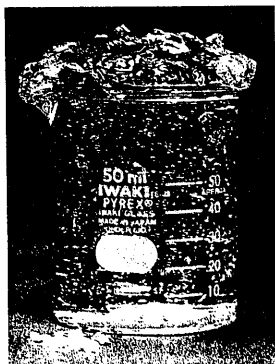
高吸水性樹脂はイオン性基をもつ電解質ポリマーをわずかに架橋したもので、自重の数百倍から1,000倍という高い吸水性をもち、水を吸収して膨潤したハイドロゲルは圧力をかけても離水しない保水性をもつ。高吸水性樹脂は、1960年代に機能性高分子材料の一つとして米国で開発され、わが国では、1976年に本格的に工業化されたのが始まりで、現在、紙オムツの他、医療、食品、園芸、建設など多くの分野で利用されている。納豆樹脂とは、納豆菌が発酵生産する再生産可能なバイオポリマーである γ -ポリグルタミン酸 (PGA) を原料とし、その分子間あるいは同一分子内で架橋させて合成した吸水性、生分解性及び可塑性を特徴とするエコマテリアルである(カット写真)。ここでは、納豆の糸から納豆樹脂の合成とその機能を活用した応用展開に関して紹介する。

●納豆樹脂の開発

納豆菌が生産するPGAはグルタミン酸が γ 結合し、重合度が5,000以上ある生分解性ポリアミノ酸で、 α 位のカルボキシル基が削除されるとナイロン4と同じ構造をとる。自然界に存在するアミノ酸はL型であるが、納豆の糸の中にはD型のグルタミン酸が含まれており、納豆の熟成につれてD型グルタミン

酸の割合が80%以上に達する。このPGA水溶液に放射線を照射するとH₂O分子から解裂、生成したOHラジカルによりPGA分子内あるいはPGA分子間でランダムに架橋反応が起こり、吸水性、生分解性及び可塑性を特徴とする納豆樹脂が得られる。納豆樹脂の合成は放射線の照射線量に依存し、吸水率はPGA濃度10%、放射線照射線量20kGyのとき自重の5,000倍に達する。放射線を照射すると架橋形成とともに吸水率は増加し、適度な照射線量で納豆樹脂の吸水率は最大に達するが、放射線照射線量の増加とともに吸水率は減少し、100kGy以上では200倍で一定になった(図1)。これは適度に架橋を形成された状態から架橋点密度の増加により納豆樹脂の網目構造が密になるためで、そのためハイドロゲル強度は増加し、1%寒天とほぼ同じゲル強度となる。このハイドロゲルはカルボキシル基を持つアニオン性ゲルで、電解質濃度の増加により吸水率は減少するが、pH3からpH11までの範囲では安定で、pH3以下では収縮することからpH応答性ゲルといえる。一方、ゲル形成はPGA分子量に依存し、PGAの重合度が低いと架橋体形成に高い照射線量を必要とした。また、 α 位のカルボキシル基の修飾は架橋体形成を阻害した。

放射線照射による納豆樹脂の製造コストは高く、実用化に向け、現在、エポキシ樹脂や金属架橋による水系での納豆樹脂の合成を行っている。



納豆の糸の成分、PGAに放射線照射して合成した納豆樹脂(左手前)と吸水後のハイドロゲル(ビーカーの中)

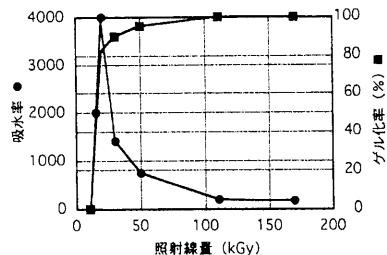


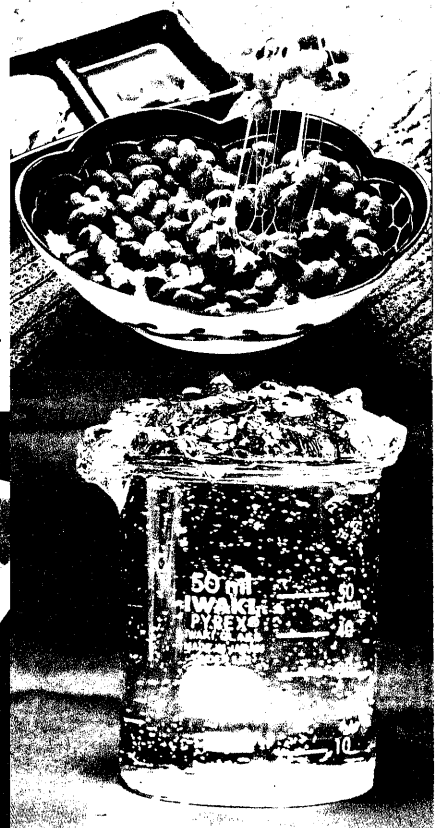
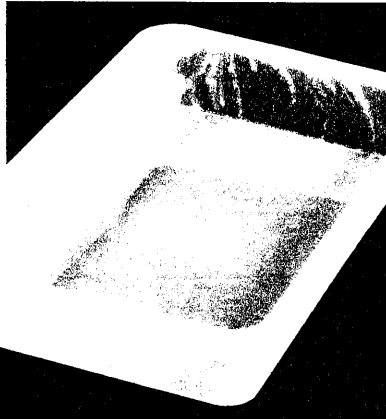
図1 吸水率とゲル化率に及ぼす放射線照射線量
● 吸水率、■ ゲル化率

地球に生きる
No.36

納豆の糸で砂漠を緑化

納豆菌を培養し、食べられるプラスチックを開発。その優れた特性を砂漠緑化プロジェクトや汚泥処理、ごみ減らしに生かす。

九州大学大学院農学研究助教授 原敏夫さん

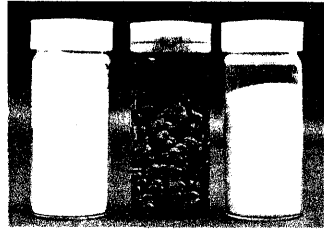


水を加えゼリー状に固らした納豆樹脂(写真右下)、納豆樹脂で作った容器(左下)、ヘドロ・ソッドベントから発芽したシロクローバー(左上)

開発した「納豆樹脂」の特性は、その夢のプロジェクトのカギを握っている。
抜群の吸水力と生分解性、可塑性を兼ね備えた樹脂
本来は微生物遺伝子工学が専門だ。納豆の研究に携わるようになったのは23年前。オーストラリアから納豆を勉強したいという留学生がやってきて、その世界を垣間見たのがきっかけだ。

食べておいしい納豆を、環境保全にも役立つ「エコー」に見ても驚かす外、研究に取り組んでいるのが、九州大学大学院農学研究助教授の原敏夫だ。構想のスケールも大きい。本質の高栄養化の原因となり処理にも困るヘドロと植物の種子を、納豆の糸を原料とする樹脂で固めてベレットにし、それを砂漠などに散布して緑をよみがえらせる。つまり雨などで流れ出し、川や湖に堆積した陸地の養分を、不毛化した大地に緑化の肥料として還元するもので、名づけて「グリーン・リサイクル・システム」。

食べておいしい納豆を、環境保全にも役立つ「エコー」に見ても驚かす外、研究に取り組んでいるのが、九州大学大学院農学研究助教授の原敏夫だ。構想のスケールも大きい。本質の高栄養化の原因となり処理にも困るヘドロと植物の種子を、納豆の糸を原料とする樹脂で固めてベレットにし、それを砂漠などに散布して緑をよみがえらせる。つまり雨などで流れ出し、川や湖に堆積した陸地の養分を、不毛化した大地に緑化の肥料として還元するもので、名づけて「グリーン・リサイクル・システム」。



写真左から精製した納豆の糸(ポリグルタミン酸)、濃度10パーセントの水溶液に放射線照射してきた納豆樹脂(ポリグルタミン酸架橋体)、それをフリーズドライしたもの



原敏夫助教授。試験管の中身は世界中の納豆菌コレクションで、200種類ほどある

研究は、納豆のネバネバのもとである菌の遺伝子を見つけていることから始まった。アジア各地から採るアフリカにまで出掛けていき、世界中の納豆菌を収集。それをもとに遺伝子の系統図を作って、納豆のルーツが中国雲南省付近であることを突き止めた。結果として、いわゆる「照葉樹林文化圏」を納豆という食文化の面から証明することに、次に着手したのが、納豆菌と大豆アレルギーの関係の研究

かけたが、九州生まれの原さんが、納豆を口にしたのもそのときが初めてだった。「エコー」な納豆菌の存在を、外国人に教えられました。こんな研究をしていると、さぞ納豆が好きなんだろうと思われがちですが、実はそうでもなくて愛し、しかし、今は健康のために、毎晩ビールで流し込んでいますよ。



納豆樹脂を活用したヘドロの有効利用 技術の開発

原 敏夫*

納豆の糸は再生産可能なバイオポリマーで、生分解性のポリアミノ酸である。この納豆の糸に放射線を照射してできる納豆樹脂は自重の4000倍の水を吸収する。しかも、土中の微生物により炭酸ガスと水に分解されるグリーン・プラスチックである。昔なじみの納豆が、浚渫ヘドロ対策の有効利用のための新たな環境素材として大きな可能性を広げようとしている。

1. はじめに

砂漠地帯は地球上で総面積3000万km²、全陸地面積の約16%を占めており、毎年約600万ha、ほぼ九州と四国を合わせた広さが砂漠化している。陸圏の砂漠化、すなわち植生の荒廃は、雨や河川を通じて年間約30億トンもの表土を流出させ、地球規模で水圏の汚濁化、富栄養化が進行し、特に湖沼、ダム、内湾や内海といった閉鎖性水域ではヘドロ堆積による水質汚濁、航路障害やダム貯水能力の低下が起きている。水圏の再生にはヘドロを系外に取り出すことがもっとも有効であるが、浚渫ヘドロの処理、処分の適地や方法など新たな環境問題を提起し、その対策は容易ではない。現在、港湾や湖沼などの広大な地域から排出される浚渫ヘドロは廃棄するか埋め戻し処理されている。その際ハンドリングできる程度にヘドロを固化する必要があり、セメントあるいはセメント系固化材が使用されている。また、アンモニアやアミン系の悪臭が汚泥または浚渫ヘドロから発生し、悪臭や異臭などの二次公害が問題となっている。

一方、高吸水性樹脂はその驚異的な吸水性と保水性から、衛生用品以外にも農業・園芸分野や土木・建設分野などでは汎用性資材として応用されている。特に、1988年から92年にかけて、エジプトを舞台に農業用保水剤を利用した節水型営農システムの開発・実証プロジェクト「グリーンアース計画」が展開され、微小な環境制御により、高吸水性樹脂の保水剤としての乾燥地農業への利用がきわめて有望であることが示唆された¹⁾。しかし、アクリル酸系高吸水性樹脂は安価なため広く利用されているものの、生分解性がほとんどなく、環境への影響が危惧されている。

ところで、ヘドロを有機物と土壌粒子とが結びつき生成した複合粒子と考えると、ヘドロは窒素やリンを含む有機資源へと一変する。ヘドロは粒度が割合よくそろっているため、土壌改良剤や植物培養土としての用途が開けてくる。すなわち、ヘドロを主要培養基材とし、納豆樹脂と種子を混和した後、ヘドロ・シードベレットを調製し、播種することで緑化をめざす発想だ。砂漠開発や砂漠化防止事業は、陸圏と水圏の生態系を相互に連

* Toshio Hara 九州大学大学院 農学研究院 遺伝子資源開発研究センター 助教授

利用 技術

放射線照射による納豆樹脂の製造



原 敏 夫

1 はじめに

高吸水性樹脂はイオン性基をもつ電解質ポリマーをわずかに架橋したもので、自重の数100倍から1,000倍という高い吸水性をもち、水を吸収して膨潤したハイドロゲルは圧力をかけても離水しない保水性をもつ。高吸水性樹脂は、1960年代に機能性高分子材料の一つとして米国で開発され、わが国では、1976年に本格的に工業化されたのが始まりで、現在、紙おむつの他、医療、食品、園芸、建設など多くの分野で利用されている。納豆樹脂とは、納豆菌が発酵生産する再生産可能なバイオポリマーである γ -ポリグルタミン酸(PGA)を原料とし、その分子間あるいは同一分子内で架橋させて合成した吸水性、生分解性および可塑性を特徴とするエコマテリアルである。

地球環境問題への関心の高まりのなか、昔なじみの納豆が、新たな環境素材として大きな可能性を広げようとしている。ここでは、放射線を利用した納豆樹脂の製造に関して紹介する。

2 納豆樹脂の合成とその特性

納豆菌が生産するPGAは、グルタミン酸がガンマ結合し、重合度が5,000以上ある生分解性ポリアミノ酸で、 α 位のカルボキシル基を

削除するとナイロン4と同じ構造となる。自然界に存在するアミノ酸はL型であるが、納豆の糸の中にはD型のグルタミン酸が含まれており、納豆の熟成につれてD型グルタミン酸の割合が80%以上に達する。発酵生産されたPGA分子内のD型グルタミン酸とL型グルタミン酸の配列順序に規則性が存在するか否か不明であるが、PGA中のD型グルタミン酸含量に依存してPGAの $[\alpha]_{25}$ は負(マイナス)の度合いが大きくなる。PGAの熱分解温度は235.9℃で、アミド結合間の水素結合は強固で、PGA分子はヘリックス構造をとる。PGA(遊離酸型)は重合度の数だけ α 位にカルボキシル基が存在する酸性タンパク質($pK_a=2.27$)で、水以外に合成ポリアミド同様ジメチルスルホキシドのような高極性非プロトン性の高沸点溶媒にのみ溶解する。PGAは納豆と一緒に摂取されており、安全性はきわめて高く、納豆菌ガムの名前でカルシウム摂取補助剤として食品添加物に使用されている。

このPGA水溶液に放射線を照射するとPGAの分子間で架橋反応が起こり、吸水性、生分解性および可塑性を特徴とする納豆樹脂が得られる^{1,2)}(図1)。納豆樹脂の合成は放射線の照射線量に依存し、吸水率はPGA濃度10%、放射

4. 講演要旨

家蚕遺伝子開発分野

日本蚕糸学大会（筑波） 3月， 2001年

カイコミトコンドリアDNAの構造と変異

○伊藤雅信・清水亨一（京工繊大応用生物）・行弘研司・瀬筒秀樹（蚕糸昆虫研）・伴野豊（九大農）

カイコ (*Bombyx mori*) はクワコ (*B. mandarina*) が家畜化されたものと考えられるが、その起原は必ずしも明らかでない。現存するカイコ品種の類縁関係を推定するため、ミトコンドリアDNAの塩基配列を調査した。

C108および青熟を用いて全域（約15.7Kb）の構造を決定した。既知の昆虫ミトコンドリアDNAとの比較から、①カイコの遺伝子配置や転写方向はクワコと違いがないことが明らかになった。また、意外なことに、この配置はキイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*, *D. yakuba*)のミトコンドリア遺伝子の配置とも (tRNA-Metを除いて) 一致した。②一方、塩基配列には少なからず種内変異が見られた。カイコ品種間の制限酵素断片長多型 (RFLP) 解析の結果もこれを支持する。

ミトコンドリアDNAの解析は、カイコの由来や品種間の類縁関係の推定に有効な手段と考えられる。

日本蚕糸学大会（筑波） 3月， 2001年

カイコの形質連関地図と分子遺伝子地図との統合—第2報—

○伴野 豊・藤井 博・西坂章文・田村 圭・西川和弘・江口誠一・中村 隆（九大農）・原 和二郎・門野敬子（蚕糸・昆虫研）

農林水産省蚕糸・昆虫農業技術研究所では cDNA クローンによるカイコの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ている。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、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材料蚕とした。B1 世代に分離した標識形質個体と正常形質個体から DNA を抽出、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。これまでの実験から13の連関群の対応が判明していたがその後、新たに4連関群について対応関係が判明した。形質連関地図の第8，13，18，23の各連関群は cDNA クローンによる地図の24，25，23，11の各連関群に対応する。

日本蚕糸学大会（筑波） 3月, 2001年

韓国産クワコ(*Bombyx mandarina*)に関する細胞遺伝学的研究

○盧 時 甲・金 京 児(慶北大農, 大韓民国)・李 在 万・伴野 豊(九州大農)

クワコは中国、日本および韓国などの東アジアに分布する野生昆虫で、カイコ(家蚕)の祖先型昆虫として多くの研究が行われてきた。これまでの研究では中国産クワコの染色体数は $n=28$ 、日本産クワコは $n=27$ 、韓国産は $n=27$ とされてきた。しかし韓国産クワコに関する今までの調査は地域・対象個体が限定されていた。韓半島の地理的な位置から考えても韓国に分布するクワコの染色体数が $n=27$ のみであるかは疑問が残る問題である。そこで、今回著者らはこのような事を明確にするために韓半島の中・南部(韓国全域)に棲息するクワコの染色体の調査を行った。

濟州島を含む10地域 14ヶ所より総196個体を採集し、この内84個体の染色体を細胞学的に観察する事が出来た。84個体のうち59個体が $n=27$ で、25個体が $n=28$ であった。この事により韓国に分布するクワコは $n=27$ と $n=28$ が共存することが明らかであり、韓半島は中国型クワコと日本型クワコの混在地域である事が明確になった。

日本蚕糸学大会（筑波） 3月, 2001年

クワコとカイコとの交雑後代から見出された油蚕遺伝子(*ows*)の座位

○中村 隆・伴野 豊・藤井 博(九大農)

1995年九州大学遺伝子資源開発研究センター保存のカイコ $w43$ 系統と福岡産クワコとの交雑後代 F_2 の蛾区において分離した皮膚の透明度が高度な油蚕は、第5連関群上の一劣性遺伝子 ows に支配されていることを明らかにしている。本研究では ows の遺伝子座位を決定するため、第5連関群の pe (淡赤眼白卵)と re (赤卵)とを基準遺伝子に用いて3点実験を行った。まず pe と re とを合わせ持つ二重劣性個体($t91$ 系統)と ows ホモの個体を交配を行い、 $pe\ ows\ re/+++$ の系統を育成を試みた。その相互交配を行ったところ、13蛾区総数4516頭における形質分離は $+$: 2630頭、 re : 44頭、 $re\ ows$: 140頭、 ows : 29頭であった。また pe 、 $pe\ re$ 、 $pe\ o$ および $pe\ ows\ re$ は、 pe 遺伝子が re 遺伝子に対して上位性を有するため区別ができないので、卵期に pe として4つを合わせて調査した(1673頭)。分離数が多い $+$ は非交叉型であり、 re と $re\ ows$ は単交叉により生じた個体、最も分離の少ない ows は二重交叉により生じた組換え個体であった。この結果を基に各遺伝子間の距離を求めたところ、 $pe-ows$ 間: 15.0%、 $ows-re$ 間: 6.5%、 $pe-re$ 間: 21.5%と算出された。従って第5連関群上でこれら3遺伝子は pe 、 ows 、 re の順に配列していることが判明した。現在 $pe-re$ 間の距離は31.7と定められているので、この値で各遺伝子間の距離を補正すると $pe-ows$ 間: 22.1%、 $ows-re$ 間: 9.6となり ows の座位は第5連関群の22.1と決定した。

S4-3

イネ種子貯蔵タンパク質に関する突然変異

熊丸敏博¹・小川雅広²・佐藤光¹

(¹九州大・院・農,²山口県立大・生活科学)

イネ種子貯蔵タンパク質は主にプロラミンとグルテリンから構成され、それぞれ別のプロテインボディに蓄積される。各タンパク質の遺伝的発現・集積機構を明らかにするために、貯蔵タンパク質に関する突然変異を選抜した。

特定のプロラミンポリペプチドが減少した変異において、野生型との交雑 F1 の当該ポリペプチドは遺伝子の量的効果を示した。この結果から、この変異体はプロラミンの構造遺伝子変異によることが明らかとなった。一方、プロラミンの複数のポリペプチドが同時に増減した変異系統について、野生型との交雑後代では、増減したポリペプチドは個体内での分離は認められず、同じ遺伝的挙動を示した。これは、プロラミンの転写調節系もしくは翻訳後修飾に関する遺伝変異であることを示唆している。

グルテリンの特定ポリペプチド欠失変異に関して、交雑 F1 においてこのポリペプチドは遺伝子の量的効果を示した。この欠失はグルテリンの構造遺伝子変異によることを示している。一方、グルテリンの前駆体を多量に集積する変異は、グルテリンの翻訳後輸送・蓄積に関する遺伝子変異であった。

S4-4

突然変異利用によるグルテリンの輸送・蓄積機構の解析

竹本陽子¹・熊丸敏博¹・小川雅広²・佐藤 光¹

(¹九州大・院・農, ²山口県立大・生活科学)

イネ種子貯蔵タンパク質、グルテリンとプロラミンはER上で同時に合成された後、異なる細胞内小器官へと輸送される。プロラミンはER内に集積され、分子量57kDの前駆体ポリペプチドとして合成されたグルテリンは、液胞へ輸送され、成熟型のグルテリンに開裂し、蓄積する。

グルテリンの輸送・蓄積の遺伝的制御機構の解明を目的として、グルテリン前駆体を多量に蓄積する変異体の免疫組織学的解析を行った。*esp2*変異体では、protein disulfid isomerase(PDI)の欠損により前駆体とプロラミンとがS-S結合を介して重合しER内に蓄積していた。*Glup1*、*glup2*変異体では前駆体とプロラミンがER内に別顆粒を作って、*glup4*変異体では両タンパク質がER内で混在して集積していた。一方、*glup3*変異体では前駆体は液胞に蓄積することが示唆された。以上の結果より、1)*Esp2*遺伝子は両タンパク質のER内分別に必須であるPDIの発現を制御する、2)*glup1*、*Glup2*遺伝子はERからの前駆体の輸送に関与する可能性がある、3)*Glup3*遺伝子は液胞内での前駆体開裂を制御する、4)*Glup4*遺伝子はER内での両タンパク質の分別に関与する、ことが示唆された。

胚乳変異体米による清酒醸造試験

神田涼子、菊永雪絵、吉井美華、岩田博、小川雅広*、熊丸敏博**、佐藤光**、○荒巻功
(酒総研、* 山口県立大、** 九州大)

【目的】 胚乳形質に関する突然変異体の中から心白構造を有する系統を無作為に選抜しその構造、性質及び醸造適性を調べ、その中で、①酒造適性が良いであろうと推定した変異体米で優良な清酒が醸造できるか、また、②従来の酒造好適米にはない特異的な構造や性質を示した変異体米が清酒醸造においてどのような影響を及ぼすのかについて小仕込試験により検討した。

【試料及び方法】 試料：九州大学農学部附属遺伝子資源研究センターで、イネの受精卵の MNU 処理により作出された胚乳突然変異体 16 点の中から醸造適性が良いとされた EM261、EM312、EM820 の 3 点 (A グループ)、特異的な構造や性質を示した EM790、EM1052、PM の 3 点 (B グループ)、対照として、親品種である金南風、台中 65 号、酒造好適米である山田錦の 3 点、計 9 点を 70% に精米したものを試料とした。

方法：小仕込試験は、総米 300g で 1 段仕込により行った。アルコール度数等一般成分、香氣成分、有機酸組成、遊離アミノ酸組成の成分分析及び官能評価を行った。

【結果】 A グループ：もろみ経過には、顕著な差は見られなかったが、米の溶解は、A グループの方がいずれ

も対照より良かった。日本酒度は、EM261、EM312、対照いずれも±0 前後であったが、EM820 のみ-6 であった。アルコール度数は、A グループの方がいずれも対照よりやや高くなった。酸度、アミノ酸度は、対照より A グループの方がいずれも低い値となった。香氣成分は、EM261 が酢酸イソアミル、イソアミルアルコールが高かった。官能試験では A グループの方が対照よりも高い評価が得られた。

B グループ：EM790 は、吸水性・消化性共に悪く、もろみでも溶解が悪く日本酒度+14 となったが、細胞壁周辺に多くの PB (タンパク質顆粒) が観察されるため、PB が溶解を阻害していると考えられた。EM1052 は、吸水性は悪いものの消化性は良く、もろみにおいても後半は溶解が進んだが、外側の胚乳細胞が強固になってきているためと考えられた。PM は、プロラミンとグルテリンが分離しなくなった変異体であるが、外側中心白様の構造を持っており、吸水性は良いものの消化性が悪かった。しかし、もろみでは初期からよく溶解が進み、上槽時の溶解量も最も多かった。しかし、酸度・アミノ酸度は他と比べて最も低くかった。

遺伝資源研究の大切さ：九州大学の活動を例にして

佐藤 光

九州大院農学研究院附属遺伝子資源開発研究センター

Importance of Research Works for Genetic Resources

The Research Activity in Kyushu University

Hikaru SATOH

Institute of Genetic Resources, Faculty of Agriculture, Kyushu University

はじめに

われわれが日常食している作物・野菜・果樹などは、その祖先野生種から長い間の改良を加えて、今日の姿をとるようになってきた。われわれの食卓にぎわすこれらの作物の多様性は、遺伝子の違いによる。すなわち遺伝子の多様性が作物や生物の多様性を生んでいると言いかえることが出来よう。したがって、品種の改良にはその元になる遺伝子の多様性が不可欠となる。生物種は誕生以来その永い歴史の過程で自然突然変異により、多様な遺伝子変異を蓄積してきた。生物の種の多様性は人間の生命・生活を維持するばかりでなく生活とアメニティーの向上にも不可欠であり、1993年ブラジルで開かれた国連環境会議でも主要議題にこの生物の種の多様性とその有効利用が挙げられた。新品種開発や生物資源の有効利用には、資源生物の多様性の維持と育種・加工などの技術開発の双方が重要であり、遺伝子資源とその情報の収集・整理・管理が強力に求められている。遺伝子資源の収集と保存は人類の将来にとって必須の要件であり、人類の貴重な財産である遺伝子資源を安定的に確保し、さらに開発、評価して有効利用を図ることは国際的課題の一つである。

しかし、遺伝子資源に対する要望は時代や社会的背景と共に変化し、しかも多岐に渡るため、それに応える体制を常に維持することが不可欠である。また、遺伝子資源は単に保存しておくだけでは意味をなさない。遺伝子資源の活用のためにはそこから情報をとり、そのデータを整理することが必要である。このような人類共有の財産である遺伝子資源を安定的に保存し、活用して行くためには、境界を越えた社会的、学際的連携が不可欠である。

九州大学農学部では地理的、社会的環境から、その創設当初から各種生物資源の探索・収集、保存と特性評価に関する研究が行われてきた。本稿では、イネを中心とする遺伝子資源の保存と研究活動につ

いて紹介したい。

九州大学における遺伝子資源研究

○九州大学における遺伝子資源の保存—現在栽培されている作物の多くは、中国を介してわが国に伝わったと考えられる。九州は中国に近く、また、福岡の板付遺跡や佐賀の菜畑遺跡に代表される縄文後期から弥生期の作物栽培遺跡と炭化した作物種子の出土等から推察されるように、わが国における作物栽培の起源地の一つと考えられる。加えて、その当時の社会的事情もあったと考えられるが、九州帝国大学農学部創設当初から、作物・育種学講座ではイネやナタネ、蚕学講座ではカイコなど、様々な作物について品種の収集とその評価が始められている。

九州大学におけるイネの系統保存は、初代の作物学講座教授 加藤茂苞博士が、当時の農務省畿内試場に収集されていたイネ品種 800 余点を九州大学に移したことに始まる。その後、大学教官の海外渡航時に持ち帰った品種、あるいは永松土巳博士が中国で収集にあたった物など、戦前にはすでに 1,000 系統を超えていた。戦後も多くの系統が導入され、現在では約 1,400 点にのぼっている。これらの系統は現在 HO 系統の名称で保存されている。

さらに、当時の農林省の依頼を受け永松博士は昭和 37 年～40 年にかけて、我が国の在来種の収集と特性調査を実施した。全国より 1,341 系統が収集され、その特性は種苗保存導入資料 2「昭和 37～40 年に収集したわが国の在来稲品種の特性」としてまとめられている(農林水産技術会議事務局、1965)。これらの品種、系統以外に、その当時の各県の奨励品種(R 系統)及び陸稲系統(UP 系統)が集められた。また、長崎に原子爆弾が投下されたが、その時被爆しその後再生したイネより採種した系統、あるいは IBP (International Biological Program) の研究計画で世界的規模で行われたイネの環境変動

607 OPa Pa Aung, T. Kumamaru, H. Satoh (Fac. Agri., Kyushu Univ). Genetic diversity of seed storage proteins in Myanmar local rice cultivars.

In order to ascertain the diversity for the possible utilization in rice improvement, local rice cultivars of a total of 348 accessions collected from six distinct regions of Myanmar (obtained from Seed Bank of Myanmar) were investigated for the variation in the seed storage proteins using SDS-PAGE and IEF analyses. The seed storage protein patterns of them were compared with "Kinmaze" (*japonica*) and "IR36" (*indica*) varieties respectively, (as standard varieties). The geographical distribution patterns were also investigated.

4 types of variation for major glutelin α subunit bands (α -1, α -2 and α -3) were detected on the basis of the molecular mass of glutelin subunit and the staining intensity by SDS-PAGE (Fig.1). Type I was smaller in molecular mass of α -3 band (fast migration), same as Kinmaze. Type II showed larger in molecular mass of α -3 band (slow migration), similar to IR36. In addition to those types, two different types were found in Myanmar local rice cultivars; type III had low intensity of α -1 subunit and type IV showed α -3 subunit consisted of 2 bands.

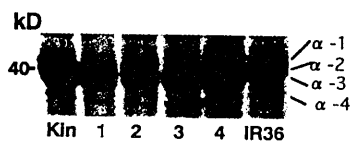


Fig. 1 Variation for glutelin α subunit seed storage protein by SDS-PAGE.

1: Type I, 2: Type II, 3: Type III, 4: Type IV



Fig.2 Variation for glutelin α -4 subunit seed storage protein by SDS-PAGE. 1: slow migration type (same as Kinmaze), 2: fast migration type (same as IR 36), 3: α -4 absent

Three types of variation for minor glutelin α -4 subunit were found. The observed variations were α -4 slow migration type same as Kinmaze, α -4 fast migration type like as IR 36 and α -4 band absent type.(Fig.2)

The variation for glutelin was also analyzed by IEF. In IEF analysis, 6 types of variation were observed on the base of presence or absence of respective bands by the comparison with Kinmaze and IR36. The relationship of SDS-PAGE and IEF in observed 150 local rice cultivars showed that type I and type II of SDS-PAGE were divided into 6 and 3 types in IEF, respectively. The results indicated that both SDS-PAGE and IEF methods are essential to find the variation of seed storage proteins. The relationship of SDS-PAGE type III, IV and IEF type is under investigation.

In the case of prolamin the variation was recorded by SDS-PAGE based on the staining intensity and the presence or absence of 13 kD, 14 kD and 15 kD bands. 14 kD band was found in only type A and B. Myanmar local rice cultivars divided into at least seven groups of variation for prolamin (Fig.3). Type C was same as Kinmaze and IR 36. Type A, B, D, E, F and G were different from Kinmaze and IR 36. Low prolamin type (type F), 15 kD low type (type D) and 13kD absent type (type G) were observed in Myanmar local rice cultivars. The frequencies of type A to G were 0.3%, 1.1%, 21%, 10%, 26.6%, 23% and 18%, respectively.

Myanmar local rice cultivars were widely diverse in both of the seed storage proteins, glutelin and prolamin.

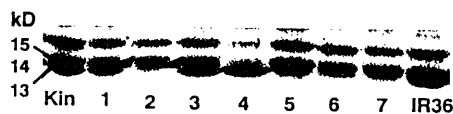


Fig. 3 Variation for prolamin seed storage protein by SDS-PAGE. 1: Type A, 2: Type B, 3: Type C, 4: Type D, 5: Type E, 6: Type F, 7: Type G

608 OJahan, M.S., T. Kumamaru, H. Satoh (Fac. Agri., Kyushu Univ.) Diversity in glutelin polypeptides of Bangladesh rice germplasm

Bangladesh rice genetic resources collected from different parts of the country were analyzed for a seed storage protein, glutelin, for the purpose of ascertaining the diversity in grain quality improvement of rice.

Seed storage proteins of five hundred and seventy six Bangladesh rice cultivars, consisting of seven ecotypes, have been analyzed by SDS-PAGE on a single seed basis. IEF analysis of the extracted glutelins (by 1% lactic acid) from endosperm of selected (74) cultivars was also done.

Rice glutelin was composed of α and β subunits, which were separated into α -1, α -2, α -3 (major bands) and α -4 (minor band) for α subunit and β -1, β -2 and β -3 bands for β subunit. The α -3 band of the variety 'Kinmaze' was smaller in molecular mass (fast migration) than that of the variety 'IR36', whereas the α -4 band of 'Kinmaze' was larger (slow migration) than that of 'IR36'. In addition to 'Kinmaze' (type 1) and 'IR36' (type 5) types, three different types were found among Bangladesh rice cultivars tested (Fig. 1A) based on staining intensity and molecular masses of major bands. They were characterized as follows; type 2 was defined by slow and fast migration of α -3 band; type 3 showed α -1 increased, α -2 decreased with slow and fast migration α -3 band; type 4 possessed α -1 increased, α -2

decreased with slow migration α -3 band. Variation pattern of the extracted glutelin (Fig. 1B) was identical with the variations in total protein, indicating that SDS-PAGE analysis of total protein is enough to elucidate glutelin variation. The number of varieties in each type was 126, 4, 2, 3 and 441, respectively. Ecotypic distribution for glutelin variation showed that type 5 was most frequent in all the ecotypes. All of the varieties showing types 2, 3 and 4 was confined to T. aman ecotype though their place of collection was different.

The variation of glutelin α -4 band was detected as α -4 fast and α -4 slow migration type (Fig. 2). Their frequency in the total germplasm was 15% and 85%, respectively. Though the latter type was found in all of the ecotypes, the former type was restricted to T. aman and B. aman ecotypes.

The SDS-PAGE variation was investigated by IEF analysis to detect the variation based on electric charges. As a result, type 1 and type 5 of SDS-PAGE in Fig. 1 were divided into 7 and 3 types, respectively by IEF, suggesting that both of SDS-PAGE and IEF analyses were important to investigate the variation in seed storage protein, glutelin. Though types 2, 3 and 4 were different by IEF, no variation has been observed within individual groups.

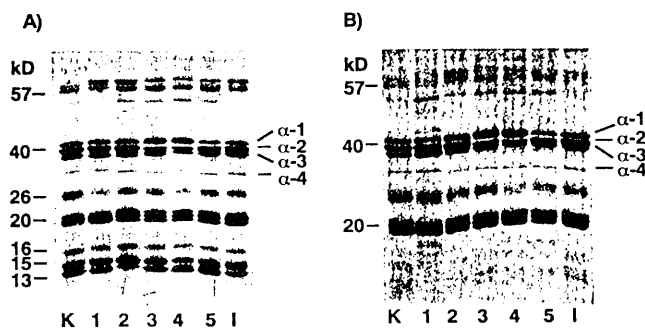


Fig. 1. Variation of glutelin α subunit in Bangladesh rice cultivars; A: Total protein; B: Extracted glutelin (by 1% lactic acid). K: Kinmaze; 1: Type 1; 2: Type 2; 3: Type 3; 4: Type 4; 5: Type 5; I: IR36.

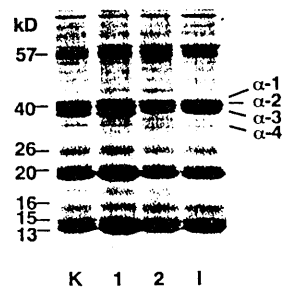


Fig. 2. Variation of glutelin α -4 band in Bangladesh rice cultivars. K: Kinmaze; 1: α -4 slow migration; 2: α -4 fast migration; I: IR36.

522 ○荒巻功1、神田涼子2、菊永雪絵2、吉井美華1、小川雅広2、熊丸敏博3、佐藤光3 (1.酒類総合研究所、2.山口県立大家政、3.九州大院農) コメ胚乳突然変異体の酒造特性
 Aramaki, I.1, R. Kanda2, Y. Kikunaga2, M. Yoshii1, M. Ogawa2, T. Kumamaru3, H. Satoh3 (1. Natl. Res. Inst. Brewing; 2. Yamaguchi Pref. Univ.; 3. Fac. Agr., Kyushu Univ.)
 Sake brewing properties of endosperm mutants in rice.

本研究では、金南風及び台中65号を親品種としてMNU処理により作出された多種類の突然変異体の中から、胚乳に心白構造を有する系統を無作為に選抜し、これらの構造、成分、物性及び清酒醸造に関する諸性質を調べ、どのような要因が酒造特性に影響しているのか検討を行った。

試料断面の心白形状は、米粒中央部の背腹軸方向に線状に存在するもの、粒の大部分を占めているもの、その中間のもの、また、心白が中心から腹側に寄ったもの、背側に寄ったものなど外観は心白であっても内部構造は様々であった。心白部分のデンプン胚乳細胞は全て丸みを帯びたアミロプラストで形成されていたが、切断によりデンプン粒が露出するものとあまり露出しないものがあった。中には露出したデンプン粒が、 α -アミラーゼの作用で不定形となったと思われるものがあったが、観察結果と玄米の α -アミラーゼ活性には関連が見られなかった。

EM(Endosperm Mutant) 790はデンプン粒が非常に小さく、アミロプラストの周囲には多くのタンパク質顆粒が観察されたが、吸水性と消化性が特に悪かった。EM820は心白の中心部がガラス質状で透明だったが、吸水性、消化性が特に良かった。またPM(Protein Mutant) F8-IIは、外側が白く、中心部が透明であるという通常の心白米とは逆の構造をしており(図1)、吸水性が最も良いにもかかわらず消化性はそれほど高くなかった。

試料のアミロース含量と粗タンパク質は吸水性と負の相関があり、リン含量は吸水性、消化性と負の

相関があった。また、DSCの糊化転移熱量は吸水性と正の相関があり、 RVAのピーク粘度、ブレイクダウンは吸水性、消化性と正、糊化開始温度は消化性と負の相関があった。

これら変異体の中から酒造特性が良いと推定したEM261、EM312、EM820を用いて親品種と山田錦を対象として小仕込試験を行ったところ、いずれももろみで順調に溶解、発酵した。(図2) 製造した清酒の官能評価では、変異体の方が対照よりも高い評価が得られ、これらは清酒醸造のための原料米として有望であると考えられた。

また、EM790は、もろみでの溶解が悪く日本酒度+14とかなり辛口の清酒となり、PBが溶解を阻害している一因と考えられた。EM1052は、吸水性が悪いものの消化性は良かったが、もろみでも同様に初期の溶解は悪いものの、もろみ後半は溶解が進んだ。これは、心白外側の胚乳細胞が強固ではあるが後半では溶解され、心白部分が露出するためと考えられた。PMF84は、もろみの初期からよく溶解が進み、総溶解量が最も多かったにもかかわらず、酸度、アミノ酸度は最も低かった。これは、これまでの常識とは異なり、原料米の有効利用の観点から非常に興味ある結果であった。

以上、心白構造を形成したコメ胚乳突然変異体の吸水性や消化性は大きく変化したが、必ずしも吸水性と消化性は連動していなかった。酒造好適米には吸水性、消化性とも良いことが要求されるが、心白という米の外観的特性のみで酒造特性が決定できるものではないことが明らかとなった。

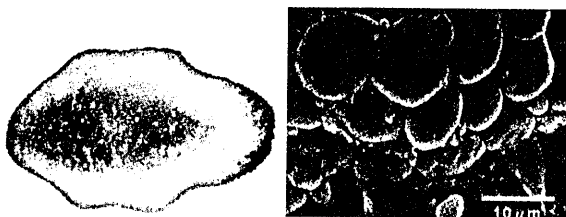


図1 PMF84の断面と外層部のアミロプラスト

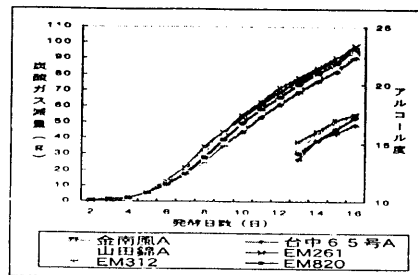


図2 小仕込試験もろみの発酵経過

1358

Protein disulfide isomerase is essential for accumulation of rice storage proteins into separate intracellular compartments.

Naoko Kawai^{1,3}, Yoko Takemoto², Mio Satoh², Aya Sugino², Changlin Wang³, Toshihiro Kumamaru², Masahiro Ogawa¹, Hikaru Satoh² and Thomas W. Okita³

¹Yamaguchi Prefectural University, Department of Life Science, Sakurabatake, Yamaguchi, 753-8502 Japan; ²Institute of Genetic Resources, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Hakozaki, Fukuoka 812-8581 Japan; ³Institute of Biological Chemistry, Washington State University, Pullman, Washington 99164-6340, USA

Plant seeds synthesize reserve “storage” proteins and deposit them in specific cellular compartments. These storage proteins falls into two major classes, globulins and prolamins, which accumulate and form protein bodies derived from the storage vacuole or endoplasmic reticulum lumen, respectively. Unlike other plants, which preferentially use only a single protein type, rice accumulates both storage protein classes to form distinct protein bodies (PBs), prolamin-containing PB-I and glutelin (globulin)-containing PB-II. A rice storage protein mutant, endosperm storage protein 2 (*esp2*), was obtained by N-methyl-N-nitrosourea treatment. This mutant has elevated levels of the 57 kD proglutelin and reduced levels of proteolytically processed acidic and basic glutelin subunits compared to wild-type. Electron microscopy revealed that *esp2* contained normal PB-II, but lacked the normal prolamin PB-I. Instead, numerous small ER-derived PBs of uniform size (0.5 μm in diameter) and low electron density were readily observed. *esp2* contains the ER luminal chaperones BiP and calnexin, but lacks protein disulfide isomerase (PDI) at both the protein and mRNA levels. These results suggest that PDI plays an essential role in PB-I formation. To determine whether PDI deficiency causes mis-assembly of storage proteins in rice endosperm, PDI-antisense rice plants are currently being constructed and will be evaluated for storage protein synthesis, assembly and deposition.

微生物遺伝子開発分野

日本放線菌学会大会（池田市） 6月、2001年

P-25 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
蒲池泰治、○西山孝、土居克実、緒方靖哉
(九大院・農院・遺資研)

【目的】 *S. azureus* BalA1 株は、気中菌糸形成能を欠損した bald 表現型を示す形質転換株である。BalA1 株は、*S. azureus* の 2.5kb 染色体断片を多コピーベクターに挿入した組換えプラスミドを保有し、本断片中には、2個の ORF (*AminDSA*, *pspSA*) が確認されている。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。

【方法と結果】 2.5kb 染色体断片を多コピーベクター-pMCP5 に挿入した pSAB931 を保有する BalA1 株と低コピーベクター-pRES18K に挿入した pRES18KA を保有する C-PRESKA 株の性状を比較し、2.5kb 断片の遺伝子量が形態分化へ及ぼす影響を検討した。両ベクターの選択マーカーとしてカナマイシン耐性遺伝子を用い、宿主として *S. azureus* ATCC14921 のプラスミドフリー株 PK100C を使用した。

C-PRESKA 株は固体培地上では、PK100C 株より孢子成熟が遅延したが、気中菌糸と孢子を形成し、気中菌糸形成不能な BalA1 株とは性質が異なった。このことから、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察した。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。これは、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形成頻度が少ないためであると推定された。さらに、培地にカナマイシンを添加した液体培養では、C-PRESKA 株の lag time は PK100C 株に pRES18K のみを導入した菌株に比べ短く、両者間で大きな差違が認められた。この結果は、2.5kb 断片が C-PRESKA 株のカナマイシン耐性にも関与する可能性を示唆した。

現在、*minDSA* のみを高コピーベクターおよび低コピーベクター上に保有する形質転換株の作製とこれら菌株の性状の検討を行っている。

B-10 *Streptomyces azureus* のMinD様およびPhosphoserine phosphatase様タンパク質をコードするDNA断片の形態分化へ及ぼす影響
○西山 孝, 蒲池泰治, 土居克実, 緒方靖哉 (九大院・農院・遺資工)

【目的】 気中菌糸形成能を欠損した *S. azureus* BalA1株から得られた2.5kb染色体断片は、放線菌の形態分化に深く関与していると推測され、2個のORF ($\Delta minDSA$, $pspSA$) が存在する。本断片を多コピーで保有するBalA1株と低コピーで保有するC-PRESKA株の性状を比較し、2.5kb断片の遺伝子量が形態分化へ及ぼす影響を検討した。

【結果】 C-PRESKA株は、個体培地上で親株に比べ孢子成熟が遅延したが、気中菌糸と孢子を形成し、気中菌糸形成不能なBalA1株とは性状が異なった。このことから、BalA1株が示す形態分化抑制には2.5kb断片の遺伝子量の増加に起因していると推察した。一方、液体培地中では、BalA1株およびC-PRESKA株の増殖は、親株に比べ良好であった。これは、両株は親株に比べ、菌糸の分岐や絡みが少なくペレット形成頻度が少ないためであると推定された。

C-6 *Streptomyces laurentii* の接合生プラスミドpSLSの遺伝子解析

○西武小百合, 酒見博士, Mangkorn Rodprapakorn, 土居克実, 緒方靖哉 (九大院・農院・遺資工)

【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の遺伝子解析を目的としている。

【方法・結果】 pSLSには、*S. phaeochromogenes*のプラスミドpJV1や*S. nigrifaciens*のプラスミドpSN22の菌糸間伝達能を示す遺伝子 *traA*, *traB*, および菌糸内伝達能を示す遺伝子 *spdB1* と相同性を持つ遺伝子が存在した。また、*S. ghanaensis*のプラスミドpSG5の *traR* の近傍領域と相同性を示す領域が *traA* 上流に存在したが、*traR* の構造を持つ遺伝子は存在していなかった。さらに、*S. coelicolor* ゲノム上の推定ORFと相同性を示す遺伝子を含む機能未知の5個のORFを検出した。

C-7 *Streptomyces azureus* pSA1.1プラスミドの*spi*遺伝子発現制御機構に関する時間的・空間的解析

○大山由紀子, 山内真理子, 横山英之, 土居克実, 緒方靖哉 (九大院・農院・遺資工)

【目的】 *S. azureus* の接合性プラスミドpSA1.1に座位する *spi* 遺伝子は *tra* 機能を有し、宿主の孢子形成を阻害する遺伝子である。本遺伝子は *imp* オペロンによって制御されると推定され、その産物Spiは膜を介したDNA転移に機能していると推測された。本研究は *spi* 遺伝子の発現時期と局在性、および *imp* 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】 Spi-EGFP融合タンパク質をコードする遺伝子断片を構築し、本遺伝子断片を導入した形質転換体を作製した。共焦点レーザー顕微鏡を用いて菌糸内での蛍光を観察したところ、*spi* は基底菌糸形成時から発現が開始されており、基底菌糸・気菌糸共に菌糸内全体で発現していた。さらに、蛍光光度計を用いて菌体のEGFP蛍光強度を経時的に測定し、*spi* の発現量を定量化した。

- A-21 コンポストから分離された *Bacillus licheniformis* No.161 の硝酸還元酵素オペロンの解析 ○川原優佳、丸山繁美、土居克実、緒方靖哉（九大院・農・遺資工）

【目的】サイレージ中における硝酸塩の蓄積による家畜の中毒が問題となっている。本研究では、硝酸態窒素をサイレージ発酵過程で低減化できる硝酸還元酵素の応用開発を目的として、コンポストから分離した強力な硝酸還元能を有する *Bacillus licheniformis* No.161 株の硝酸還元酵素群の遺伝子解析を行った。

【方法と結果】*E. coli* および *B. subtilis* では、硝酸還元酵素は4つの遺伝子 (*narG*, *narH*, *narJ*, *narI*) から成る *nar* オペロンを形成している。これらの遺伝子の塩基配列を基に、No.161 株の *narG*、および *narG* の上流に位置する *ywiC* と *ywiD* の全配列を決定し、また *narG* 下流に位置する *narH* の部分配列を得た。これらの結果から、No.161 株は *B. subtilis* と類似した *nar* オペロン構造をとっていることが示唆されたが、プロモーター領域を含むオペロンの上流域が *B. subtilis* では約 200bp であるのに対して No.161 株は約 2.5kb と長く、両者に相異が見られた。

- C-21 *Thermus* sp. TMY 株の増殖とシリカスケール形成に及ぼすアルミニウムの作用 ○権藤友昭、川津領一、稲垣史生、土居克実、井澤英二*、緒方靖哉（九大院・農院・微生物遺伝子工学、*工院・地球工学）

【目的】シリカスケールより分離した *Thermus* sp. TMY 株は、400 ppm 以上の過飽和シリカ溶存液体培地で培養すると生育が阻害されるが、対数増殖期後期から培養中にシリカスケールを形成する。本研究では、TMY 株の増殖および培地中でのシリカスケール形成に及ぼすアルミニウムイオンの影響を検討した。

【方法・結果】TM 培地 (pH 7.2) および過飽和シリカ (シリカ濃度 600 ppm; pH 7.2) 溶存 TM 培地に $Al(NO_3)_3$ を Al 濃度が 5、50、100、200 ppm となるように添加し、振とう培養 (75°C、200 rpm) を行い、TMY 株の増殖を検討した。菌体増殖は Al 濃度に比例して阻害され、特に 200 ppm では、無添加培養での定常期の OD_{660} 値と比較して約 40% 低下した。一方、シリカ溶存培地中では、Al 単独添加の培養と比較して、菌体増殖が増大した。また、Al 濃度 200 ppm ではシリカスケール形成とその形成に関与していると考えられているタンパク質 Sip の産生が認められなかった。これらの結果は、シリカと Al イオンはそれらの TMY 株に対する影響を互いに抑制し合うことを示している。

シンポジウム「遺伝子組換え食品と私たちの暮らし」（福岡市 2002年2月）

（3）福岡会場

開催日時 平成14年2月22日（金） 13:30~16:00

開催場所 福岡国際ホール 大ホールA

参加人員 120人

主 催 財団法人食生活情報サービスセンター

共 催 福岡県

<シンポジウム「遺伝子組換え食品と私たちの暮らし」>

コーディネーター

窪田 富 財団法人食生活情報サービスセンター専務理事

パネリスト

金山武史 農林水産省総合食料局品質課食品表示対策室課長補佐

木原満博 福岡県豆腐協同組合理事長

原 敏夫 九州大学農学部助教授

矢野葉子 財団法人福岡県消費者協会消費生活コンサルタント

<原>

私は、納豆の糸を使って生分解性のプラスチックを作って、これで砂漠の緑化をやろうということを考えていまして、その段階でどうしても植物を砂漠に植えないといけない。環境耐性を持った植物を導入せざるを得ないという段階にきています。それと同時にエイズウィルスのワクチンを作ろうということで、エイズのある特定のタンパク質をたくさん作る技術開発を行なっています。遺伝子組換え食品の場合には、不特定多数の方の口に入るわけなんですけれども、こういった目的のものは選択の余地のない方に対して与える形になります。

こういったことをなぜやっているかということ、学生の頃から夢がありまして、牧場ですと、牛を飼っていて、毎日餌をあげます。1年ちょっと経つと牧場から牛が出ていきます。単純に考えると、ある枠があって、入り口のところに草を入れておくと1年ちょっと経つと牛肉の固まりがポロっと出てくることになります。この1年6カ月ぐらいかかるところを1時間か2時間でできないか。草の変わりに例えばDNAを入れてやって、肉の形で出てこないかと、そういったことをやりたいという夢がありまして、それが遺伝子組換えに入るきっかけになりました。あるブラックボックスみたいなものを作って、時間がかかってきたものを短縮して、なおかつちょっとしかできなかったものをうんと作ることができないか、そういったことを考えてやっています。

このごろ要求されているのは、倫理面と安全の確保にものすごく枠を置いて取り組んでいます。今までは単に組換えDNAの実験指針というのが文部科学省から出ていて、生物的封じ込めとか、物理的封じ込めとかいって、取り扱うものが外に出て変な害を及ぼしてはいけないという、枠組みだけだったんですけれども、今はいろんな人を対象にすることができてきましたから、いろんな枠があります。当然組換え食品の場合にも農林水産省が決めたガイドラインがありますし、その範疇の中で枠を決めて仕事を始めます。それから一番大きな違いというのは、人権社会的コンセンサス及び利益保護への配慮、これを十分

日本農芸化学会大会 (仙台) 3月、2002年

- 2-5Aa03 高度好熱菌 *Thermus* sp. TMY株の自然形質転換能に関する研究
○藤井 秀俊、稲垣 史生¹、土居 克実、緒方 靖哉 (九大院農院・遺資工、¹海洋科技セ・深海環境フロンティ)

【目的】 これまでに、シリカ鉱物から分離した高度好熱菌 *Thermus* sp. TMY株が、溶存シリカの鉱物化に関与することを明らかにした。本株が産生するシリカ誘導性タンパク質 Sip の大量調製のため、現在、TMY株を宿主としたタンパク質大量発現系の確立を検討しており、TMY株の自然形質転換能を検討したので報告する。

【方法及び結果】 自然形質転換能を利用し、TMY株、*T. thermophilus* HB8^T株、*T. thermophilus* HB27株 を形質転換したところ、形質転換効率は、それぞれ 3.1×10^{-8} 乗、 3.1×10^{-5} 乗、 2.7×10^{-4} 乗であった。形質転換法としてエレクトロポレーションを試みたが、転換効率は自然形質転換と同程度だった。TMY株の形質転換体からベクターDNAを調製し、TMY株に再導入したところ、転換効率は 1.2×10^{-5} 乗になった。また、TMY株にはプラスミドが存在することも明らかになった。TMY株の自然形質転換能の低下は、宿主あるいはプラスミドに由来する制限-修飾系やプラスミドの共存に依ることが考えられた。

日本農芸化学会大会 (仙台) 3月、2002年

- 2-6Da05 *Streptomyces azureus* の自然誘発性pock 形成に関する溶原性ファージSA12 ゲノムのクローニングおよび構造解析
○山田 修司、土居 克実、緒方 靖哉 (九大院農・遺資工)

【目的】 *Streptomyces azureus* 野生型株PK0 (ATCC14921) の固体培地上の菌叢で形成される自然誘発性pock (S pock) には、多数のファージSA12 粒子の存在が検出される。*S. azureus* のS pock 形成には、エピソーム性・接合性プラスミドpSA1 および溶原性ファージSA12 が関与すると推測した。これまでの研究では主にpSA1 についてのアプローチがなされてきたが、本研究では、SA12 のゲノムDNAを抽出・クローニングし、構造・機能解析を行って、S pock 形成への関与を明らかにすることを目的とした。

【方法と結果】 PK0株のRye flakes寒天培地上の菌叢からファージ粒子を回収・精製し、DNA を抽出した。本DNA は、大きさが約40kb で、*cos* 配列が存在し、また *S. azureus* DNA とのサザンハイブリダイゼーションの結果、宿主DNA 上に存在したことから、SA12ゲノムと推定した。SA12 ゲノムの塩基配列、宿主ゲノム上でのSA12 プロファージの座位等の解析を行っている。

日本農芸化学会大会 (仙台) 3月、2002年

- 3-5Ap11 冬虫夏草菌 *Cordyceps militaris* の交配型遺伝子 *MAT1-2-1*
○横山 英之、伊東 達雄¹、河内 一郎¹、中谷 善博¹、氏田 稔¹、
原 彰¹ (名城大・農学ハイテク、¹名城大農・応生化)

【目的】冬虫夏草菌を用いた有用物質生産における問題点として、子嚢果や分生子柄を、大量に生産することが困難な点があげられる。生殖機構の解明は、有用物質生産等の応用面だけではなく、完全体と不完全体の関係を明らかにする基礎的側面からも期待される。本研究は、冬虫夏草菌の生殖機構の解明を目的として、まず冬虫夏草菌の交配型遺伝子の検討を行った。

【方法と結果】冬虫夏草菌 *C. militaris* の属する真正子嚢菌類において、交配型 *MAT-1* と *MAT-2* は、それぞれ交配型遺伝子座 *MAT1-1* と *MAT1-2* によって決定されることが報告されている。既知の *MAT1-2-1* において保存されているアミノ酸配列を基にしてプライマーを合成し、*C. militaris* 4株および系統的に比較的近縁な *Beauveria* sp. 1株の染色体DNAを鋳型としたPCRを行い、*MAT1-2-1* 遺伝子の部分配列を得た。この結果から、冬虫夏草菌においても、*MAT1-2-1* が関与して交配型や交配後の分化が制御されていることが示唆された。

日本農芸化学会大会 (仙台) 3月、2002年

- 3-5Ap17 コンポストから分離された *Bacillus licheniformis* No. 161 の硝酸還元酵素オペロンの解析と応用開発
○川原 優佳、丸山 繁美、土居 克実、大桃 定洋¹、緒方 靖哉 (九大院農・遺資工、¹農水省)

【目的】サイレージ中における硝酸塩の蓄積による家畜の中毒が問題となっており、サイレージ発酵過程での硝酸態窒素の低減化が重要な課題になっている。本研究では、コンポストから分離した強力な硝酸還元能を有する *Bacillus licheniformis* No. 161 株の硝酸還元酵素群の遺伝子解析を行い、硝酸還元酵素の応用開発を目的としている。

【方法と結果】*E. coli* および *B. subtilis* では、硝酸還元酵素は4つの遺伝子 (*narG*, *narH*, *narJ*, *narI*) から成る *nar* オペロンを形成している。これらの遺伝子の塩基配列を基に、No. 161 株の *narG*, *narH*, *narJ* および *narG* の上流に位置する *ywiC* と *ywiD* の全配列を決定し、また *narJ* 下流に位置する *narI* の部分配列を得た。これらの結果から、No. 161 株は *B. subtilis* と類似した *nar* オペロン構造をとっていることが示唆されたが、プロモーター領域を含むオペロンの上流域が *B. subtilis* では約200bpであるのに対してNo. 161 株は10RFを含む約2.5kbと長く、両者に相異があった。

- 3-5Ca08 *Thermus* sp. TMY株の増殖に及ぼすシリカとアルミニウムの作用
○榎藤 友昭、川津 領一、稲垣 史生¹、土居 克実、井澤 英二²、
緒方 靖哉 (九大院農・遺資工、¹海洋科技セ・地殻内微生物、²九
大院工・地球工)

【目的】シリカスケールより分離した *Thermus* sp. TMY株は、400 ppm以上の過飽和シリカ含有液体培地で培養するとシリカスケールを形成する。本研究では、TMY株の増殖およびシリカスケール形成に関与すると考えられている膜タンパク質 Sipの産生に及ぼすAlイオンの影響を検討した。

【方法・結果】TM培地および600 ppmシリカ含有TM培地にAl濃度が50-200 ppmとなるように添加し、75℃で振とう培養を行い、TMY株の増殖を検討した。菌体増殖はAl濃度に比例して阻害された。また、Al存在下で前培養した菌体はAl-toleranceを示した。シリカ含有培地中では、Al単独添加の培養と比較して、菌体増殖が増大した。これらの結果は、シリカとAlはそれらのTMY株に対する影響を互いに抑制し合うことを示している。一方、シリカ誘導性Sipタンパク質の産生はAlによって影響された。

- 3-6Cp11 西南暖地型サイレージから分離した乳酸菌株の分子系統解析
○西崎 陽祐、土居 克実、森 勝美¹、大桃 定洋¹、緒方 靖哉 (九
大院農院・遺資工、¹農林水産省)

【目的】これまで、西南暖地型サイレージより分離した *Lactobacillus*属乳酸菌について、菌学的特徴を基に分類してきた。本研究では、分子生物学的手法を用い、分離菌株のより正確な同定を試みた。

【方法及び結果】分離菌11株は、16S rDNA V2-V3 regionの塩基配列の解析によって、*Lactobacillus*属に分類されたが、明瞭な種の同定には至らなかった。次に、16S-23S intergenic spacer regionの塩基配列の解析を行い、5菌株が *L. plantarum*もしくは *L. pentosus*と、1菌株が *L. casei*と高い相同性を認めた。しかし、5菌株は、既知の種と有意な相同性が認められなかった。そこで、RAPD-PCR解析を行ったところ、基準株と同一の泳動パターンは得られなかったものの、近似した泳動パターンが認められた。これらの結果から、当該菌株の同定は可能であると判断すると共に、基準株と若干異なった泳動パターンを示したことは、分離菌株が高温適応性や耐酸性など、基準株と異なる特性を保有しているために、ゲノムレベルで多少の変異が生じていると推察した。

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
（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

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

岡田太郎 カイコの胚子発生過程に関与するRNA結合タンパク質に関する研究

訪問教授・研究員

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

土田 耕三（国立感染症研究所）
カイコの遺伝子資源の特性調査研究

鐘 伯雄（中国，浙江大学）

カイコの遺伝子資源の特性調査研究

外国人来訪者

盧 時甲（韓国，慶北大学）

洪 善美（韓国，慶北大学）

姜 旺旭（韓国，慶北大学）

【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）

- | | |
|--------|---|
| 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 |
| 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 |
| 柴原 賢介 | イネ胚乳ホスホリラーゼに関する遺伝学的研究 |
| 田中 康昌 | イネ胚乳突然変異 <i>flo3</i> に関する遺伝学的研究 |
| 杉野 彩 | イネ胚乳特異的プロテインジスルフィドイソメラーゼに関する遺伝学的研究 |

大学院生物資源環境科学研究科（博士課程）

- 山下 和宏 イネ胚乳デンプンに関する遺伝・育種学的研究
- 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 M Sarwar バングラディシュイネの遺伝子資源学的研究
- Pa Pa Aung ミャンマーイネの遺伝子資源学的研究
- 吉田 陽子 イネのAGPase に関する変異体の生理遺伝学的研究

【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）

- 岩武 敦史 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
- 川原 優佳 硝酸還元菌 *Bacillus licheniformis* No.161の硝酸還元オペロンの解析と機能開発
- 権藤 友昭 高度好熱菌*Thermus* sp. TMYによるシリカ沈殿機構の解析

武智 慎平 *Streptomyces azureus* 属放線菌のPhosphoserine phosphatase様遺伝子の機能解析

西崎 陽祐 サイレージ乳酸菌の分子系統解析と有用遺伝子の解析

藤井 秀俊 高度好熱菌における大量発現系の確立

大学院生物資源環境科学研究科（博士課程）

村田 匡礼 生体外蛋白質合成系の高効率化

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

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

特定学術研究者

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

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」

研究鵜成果公開促進費 研究代表 藤井 博、分担 伴野 豊
「カイコ遺伝子資源データベース」

基盤研究 (B) 研究代表 伴野 豊、分担 藤井 博
「DNA・精子レポジトリの構築によるカイコ遺伝子資源の活用と保存」

基盤研究 (B) 分担 伴野 豊

「鱗翅目昆虫における無核精子の機能解明と精子保存への機能利用—無核精子の機能を利用した凍結精子人工授精による家蚕遺伝子資源の恒久保存への応用—」

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」

株式会社 オリノバ

「イネの胚乳成分に関する育種」

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 研究分担 土居克実
「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、土居克実
「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」

3. 講演会・セミナー・講習会

植物遺伝子開発分野

平成13年11月13日

熊丸敏博

「遺伝子組み換え農産物」 福岡県立城南高等学校、

微生物遺伝子開発分野

平成13年8月23日

夏のバイオ教室（高校生のためのバイオ体験学習）

実行委員長 緒方靖哉

平成13年10月20日

土居克実

「微生物の世界 ～小さな体に秘めた大きなパワー～」 福岡県立伝習館高等学校

4. 海外渡航

【家蚕遺伝子開発分野】

藤井 博

中華人民共和国（北京）
2001年9月27日～2001年10月2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）
2001年6月11日～2001年6月16日
文部省科学研究費補助金 基盤研究（A）
「カイコキモトリプシンインヒビターの生理機能に関する研究」

【植物遺伝子開発分野】

熊丸敏博

アメリカ合衆国（ワシントン州立大学、米国細胞生物学会出席）
2001年12月7日～12月26日
文部科学省創造開発研究在外研究費
「イネ種子貯蔵タンパク質に関する研究打ち合わせ」

【微生物遺伝子開発分野】

緒方 靖哉

タイ国（チュラロンコン大学）
2001年6月19日～6月26日
「The Golden Jubilee project によるチュラロンコン大学理学部大学院学生
の博士論文指導」

カナダ・米国（カナダ Laval 大学、米国 EvergreenState College）
2001年7月31日～8月13日
文部科学省 創造開発研究員費
「微生物遺伝子資源の利用開発についての調査」

原 敏夫

中華民国
2001年12月27日～12月29日
台北大学にて研究打ち合わせ

土居 克実

カナダ・米国（カナダ Laval 大学、米国 EvergreenState College）
2001年7月31日～8月13日
文部科学省 創造開発研究員費
「有用遺伝子資源の探索と有効利用」

大韓民国（順天大学校）
2001年11月26日～12月1日
「九州大学 - 順天大学校間の学生交流事業」

タイ国（カセサート大学、チュラロンコン大学）
2001年12月12日～12月18日
日本学術振興会 拠点大学方式学術交流事業
「好熱性乳酸菌の産業利用」

外国人来訪者

学会賞受賞等

【家蚕遺伝子開発分野】

藤井 博 2001年度 中華人民共和国 友誼賞受賞

【微生物遺伝子開発分野】

緒方 靖哉 2001年度 日本放線菌学会 学会賞

6. 学術会議の開催・運営

【植物遺伝子開発分野】

日本育種学会第100回講演会・第43回シンポジウム・50周年記念シンポジウム

2001年10月7日～10月9日

一般講演315題、シンポジウム11題、グループ研究集会5題

九州大学文系地区

記念シンポジウム6題

創立五十周年記念講堂

公開ポストシンポジウム4題

NTT夢天神ホール

参加者632名

大会運営委員長： 佐藤 光

大会運営委員： 吉村 淳、熊丸 敏博、安井 秀、土井 一行、竹本 陽子

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×w32×190, 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190系統を1985年に交雑し*Xan*を標識形質として導入した育成系統であることを示す。遺伝子情報の概要は「家蚕遺伝子資源系統の特性情報増補第2版—1998—Genetical stocks and mutations of Bombyx mori: important genetic resources」に記載している。

(分譲)

Peter Andolfatto エジンバラ大学 (英国)

クワコ

姜 永 煌 浙江大学 (中国)

c60

b84

梶浦善太 信州大学繊維学部

d90

w12

中垣雅雄 信州大学繊維学部

o22

xa502

古沢 壽治 京都工芸繊維大学繊維学部

l30

蜷木 理 東京農工大学農学部

p62

p50

広川昌彦 独立行政法人農業生物資源研究所

f09

f21

吉田昭広 JT生命誌研究館
クワコ

赤井 弘 東京農業大学
クワコ

中島裕美子 琉球大学
クワコ

小林 正彦 東京大学大学院農学生命科学研究科
d20
d30
d32
o80
u71

薦 洪 九州大学比較社会文化研究科
5 齡幼虫

竹村洋子 蚕業技術研究所
e81
g33
u49

土田 耕三 感染症研究所
F50
F501

桑原鉄次 長崎東高等学校
蛹

橋本 光政 兵庫県山崎高等学校
r03
p22

原 彰 名城大学農学部
蛹

長岡 純治 京都工芸繊維大学繊維学部

b40

b41

高橋 進 山口大学農学部
d32蛹

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

これらの系統の一部をデータベースとして公開している。

(http://w3.grt.kyushu-u.ac.jp/Rice_Kyushu/rice-kyushu/htdocs/main.html)

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
2001	260	2-964		6-339	4-37

微生物遺伝子開発分野

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

現在、以下のような菌株を保存している。

I. 細菌

- (A) 基準株 *Bacillus*属、*Cellulomonas*属、*Lactobacillus*属、*Lactococcus*属、*Pseudomonas*属、*Thermus*属および大腸菌 47種99株
- (B) 分離株 *Bacillus*属、*Lactobacillus*属、*Lactococcus*属、*Pediococcus*属、*Pseudomonas*属、*Enterococcus*属及び*Thermus*属 24種905株
- (C) 変異株 *Bacillus*属、*Lactobacillus*属および*Thermus*属 15種45株

II. 放線菌

- (A) 基準株 *Micromonospora*属、*Nocardia*属、*Rhodococcus*属、*Streptomyces*属
および*Streptoverticillium*属 155種171株
- (B) 分離株 *Streptomyces*属 5種5株
- (C) 変異株 *Streptomyces*属 10種283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 135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
102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 35種類
- (B) 分離ファージ 乳酸菌および放線菌系統 135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

Lactobacillus plantarum JCM1057

Lactobacillus rhamnosus JCM1136

Lactobacillus pentosus JCM1558

Streptomyces abikoensis JCM4002

Streptomyces bikiniensis JCM4011

Streptomyces lincolnensis JCM4287

Streptomyces nodosus JCM4297

(分譲)

Dr. Surina Chavanich (Associate Professor)

Department of Microbiology, Faculty of Science, Chulalongkorn University

Streptomyces azureus PK100C

Streptomyces coelicolor A3(2)

Streptomyces griseus NRRL2926

V. センター規程

九州大学農学部附属遺伝子資源開発研究センター規程

(趣旨)

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

(センターの目的)

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

(分野)

第三条 センターに、次の分野を置く。

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

(センターの長)

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

2 センターの長は、センターの管理及び運営を総括する。

3 センターの長の任期は、二年とする。

4 センター長は、再任されることができる。

(運営委員会)

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

第六条 運営委員会は、委員長及び次の各号に掲げる委員をもって組織する。

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

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

第七条 委員長は、センターの長をもって充てる。

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

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

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

(雑則)

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

附則

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

VI. 英文摘要

INSTITUTE OF GENETIC RESOURCES

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

Silkworm Genetics Division

FUJII, Hiroshi	Ph.D.	Professor
BANNO, Yutaka	Ph.D.	Associate Professor
YAMAMOTO, Koji	Ph.D.	Assistant 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

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

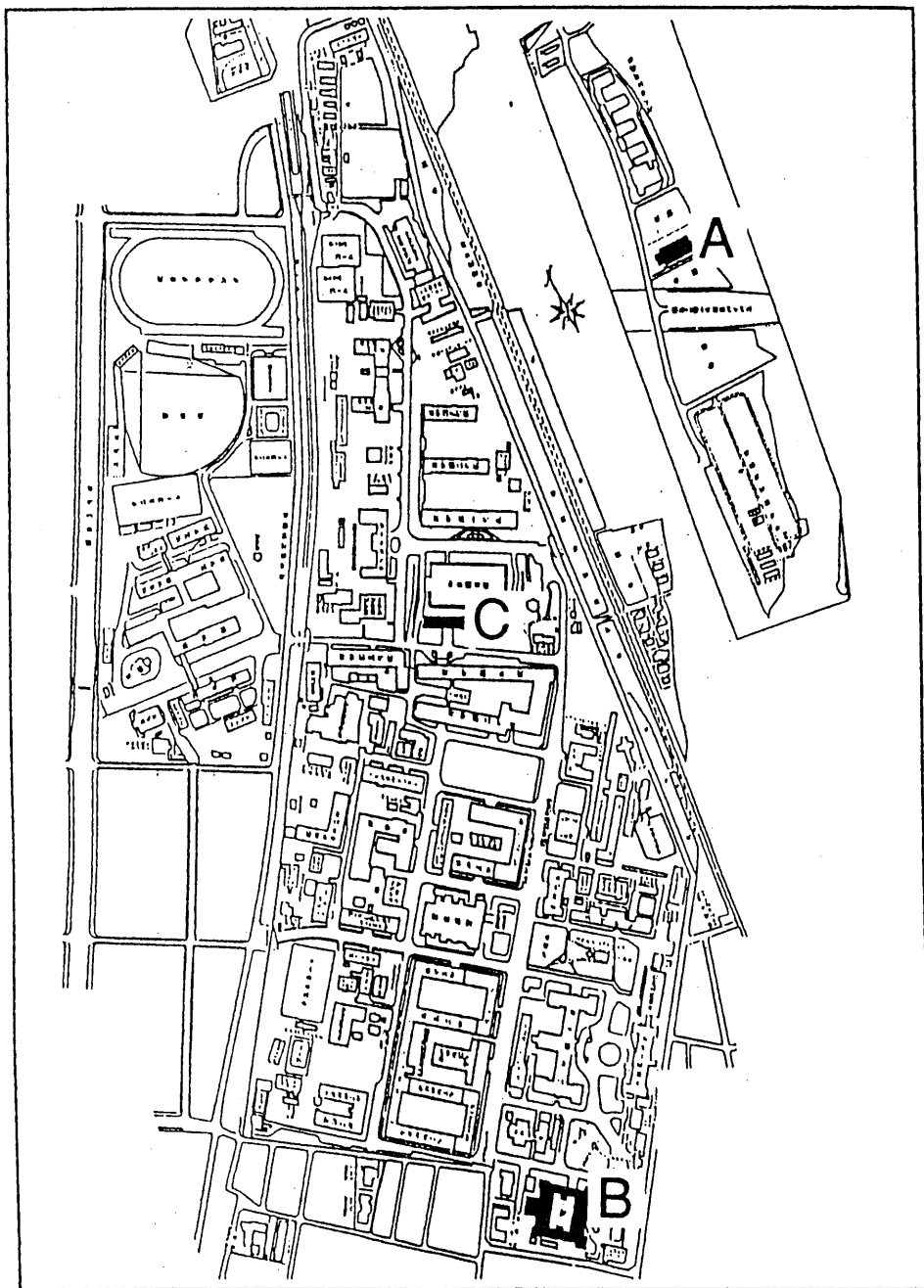
- a) Collection, evaluation and preservation of rice genetic resources
- b) Mutagenesis and mutation spectrum in rice
- c) Genetic analysis of induced mutants in rice: Starch, protein and lipid stored in grain
- d) Genome analysis of the useful genes in rice
- e) Isozyme variation in rice, barley and their relatives

Microbial Genetics Division

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

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

VII. センター研究棟配置図



A 家蚕遺伝子開発分野：

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

B 植物遺伝子開発分野：

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

C 微生物遺伝子開発分野：

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

編集後記

九州大学農学部附属遺伝子資源開発研究センター年報第5号を発刊いたします。

新たな世紀を迎え、巷間、様々な展望や夢が語られております。その中でも「21世紀はバイオの世紀」という言葉が新聞・雑誌をはじめ様々なメディアで見受けられます。このように熱い注目が注がれているバイオ研究ですが、その基本には常に各種生物の遺伝子資源の存在があります。文部科学省によるナショナルバイオリソースプロジェクトの実施も現今の研究動向や国家的戦略に即しているものと考えられます。

このような社会情勢・研究の流れからも本研究センターが社会に貢献する役割の重要性は計り知れないものがあると思われます。これらの期待・責務に応えられるよう、センター各員が力を併せて奮闘努力する所存であります。

国立大学の独立行政法人化や大学移転問題など、九州大学農学部も変革の中にあります。今後とも本年報にご意見ご鞭撻を賜りますようお願い申し上げます。

編集者

代表 緒方 靖哉
熊丸 敏博
土居 克実
山本 幸治
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 5 号
平成14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