

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8号

平成16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	6
	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	43
	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	53
V.	センター規程	60
VI.	英文摘要	62
VII.	センター研究棟配置図	64

I. センターの概要

1. 目的

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

2. 沿革

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

家蚕遺伝子開発分野

教授	藤井 博	技官	西坂 章文
助教授	伴野 豊	技官	田村 圭
助手	山本 幸治	技術補佐員	江口 誠一
技官	西川 和弘	教務補佐員	何 寧佳

植物遺伝子開発分野

教授	佐藤 光	テクニカルスタッフ	松坂 弘明
助教授	熊丸 敏博	非常勤補佐員	原田 良子
		非常勤補佐員	馬場 知佐子
		非常勤補佐員	藤田 喜久男

微生物遺伝子開発分野

助教授	原 敏夫	研究支援推進員	永原 彰子
講師	土居 克実		

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

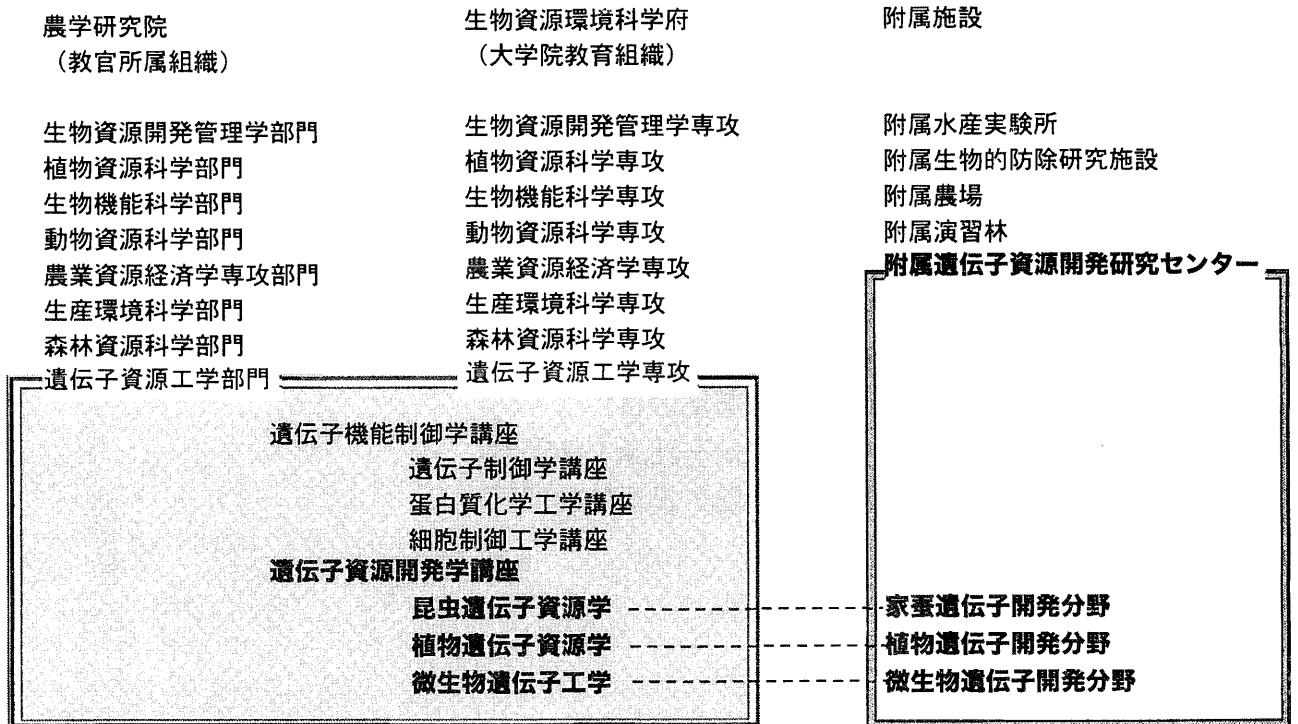
微生物遺伝子資源の探索と評価、保存と利用開発、並びに有用遺伝子の高度機能化と応用展開に関する研究

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. 遺伝子資源開発研究センター運営委員会委員（平成16年4月1日現在）

- 委員長 藤井 博
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部門）
助教授 齋藤 和幸（植物資源科学部門）
教授 木村 誠（生物機能科学部門）
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 堤 祐司（森林資源科学部門）
助教授 岡野 香（附属農場）
教授 小川 滋（附属演習林）
教授 久原 哲（遺伝子資源工学部門）
助教授 麻生 陽一（遺伝子資源工学部門）

6. 組織図



II. 研究成果 (2004年度)

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

Tsuchida, K., Katagiri, C., Tanaka, Y., Tabunoki, H., Sato, R., Maekawa, H., Takada, N., Banno, Y., Fujii, H. and Jouni, Z.E.: The Basis for Colorless Hemolymph and Cocoons in the *Y*-gene recessive *Bombyx mori* Mutants: A Defect in the Cellular Uptake of Carotenoids. *J. Insect Physiol.*, **50**, 975-983 (2004)

Tsuchida, K., Jouni, Z.E., Gardetto, J., Kobayashi, Y., Tabunoki, H., Azuma, M., Sugiyama, H., Takada, N., Maekawa, H., Banno, Y., Fujii, H., Iwano, H., and Wells, M.A.: Characterization of the carotenoid-binding protein of the *Y*-gene dominant mutants of *Bombyx mori*. *J. Insect Physiol.*, **50**, 363-372 (2004)

He, N., Fujii, H., Kusakabe, T., Aso, Y., Banno, Y., Yamamoto, K.: Overexpression in *Escherichia coli* and purification of recombinant CI-b1, a Kunitz-type chymotrypsin inhibitor of silkworm. 2004. *Protein Expr. Purif.*, **38**(1), 9-16 (2004)

He, N., Aso, Y., Fujii, H., Banno, Y., and Yamamoto, K.: In vivo and In vitro Interactions of the *Bombyx mori* Chymotrypsin Inhibitor b1 with *Escherichia coli*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **68**, 835-840 (2004)

Wang, Y., Zhang, P., Fujii, H., Banno, Y., Yamamoto, K., Aso, Y.: Proteomic studies of lipopolysaccharide-induced polypeptides in the silkworm, *Bombyx mori*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **68**, 1821-1823 (2004)

Zhang, P., Yamamoto, K., Wang, Y., Banno, Y., Fujii, H., Miake, F., Kashige, N., and Aso, Y.: Utility of dry gel from two-dimensional electrophoresis for peptide mass fingerprinting analysis of silkworm proteins. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **68**,

II. 研究成果（2004年度）

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

Tsuchida, K., Katagiri, C., Tanaka, Y., Tabunoki, H., Sato, R., Maekawa, H., Takada, N., Banno, Y., Fujii, H. and Jouni, Z.E.: The Basis for Colorless Hemolymph and Cocoons in the *Y*-gene recessive *Bombyx mori* Mutants: A Defect in the Cellular Uptake of Carotenoids. *J. Insect Physiol.*, **50**, 975-983 (2004)

Tsuchida, K., Jouni, Z.E., Gardetto, J., Kobayashi, Y., Tabunoki, H., Azuma, M., Sugiyama, H., Takada, N., Maekawa, H., Banno, Y., Fujii, H., Iwano, H., and Wells, M.A.: Characterization of the carotenoid-binding protein of the *Y*-gene dominant mutants of *Bombyx mori*. *J. Insect Physiol.*, **50**, 363-372 (2004)

He, N., Fujii, H., Kusakabe, T., Aso, Y., Banno, Y., Yamamoto, K.: Overexpression in *Escherichia coli* and purification of recombinant CI-b1, a Kunitz-type chymotrypsin inhibitor of silkworm. 2004. *Protein Expr. Purif.*, **38**(1), 9-16 (2004)

He, N., Aso, Y., Fujii, H., Banno, Y., and Yamamoto, K.: In vivo and In vitro Interactions of the *Bombyx mori* Chymotrypsin Inhibitor b1 with *Escherichia coli*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **68**, 835-840 (2004)

Wang, Y., Zhang, P., Fujii, H., Banno, Y., Yamamoto, K., Aso, Y.: Proteomic studies of lipopolysaccharide-induced polypeptides in the silkworm, *Bombyx mori*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **68**, 1821-1823 (2004)

Zhang, P., Yamamoto, K., Wang, Y., Banno, Y., Fujii, H., Miake, F., Kashige, N., and Aso, Y.: Utility of dry gel from two-dimensional electrophoresis for peptide mass fingerprinting analysis of silkworm proteins. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **68**,

植物遺伝子開発分野

A 原著論文

Kubo A., S. Rahman, Y. Utsumi, Z. Li, M. Yamamoto, M. Ugaki, K. Harada, H. Satoh, C. Konik-Rose, M. Morell and Y. Nakamura: Complementation of *sugary-1* phenotype in rice endosperm with the wheat *Isoamylase1* gene supports a direct role for isoamylase1 in amylopectin biosynthesis. *Plant Physiol.* **137**: 43-56 (2004)

Tanaka N., N. Fujita, A. Nishi, H. Satoh, Y. Hosaka, M. Ugaki, S. Kawasaki and Y. Nakamura: The structure of starch can be manipulated by changing the expression level of starch branching enzyme IIb in rice endosperm. *Plant Biotechnol. J.*, **2**: 507-516 (2004)

中村澄子、岡留博司、與挫宏一、原口和朋、奥西智哉、鈴木啓太郎、佐藤光、大坪研一: PCR法による世界の広範囲な特性の米の識別および食味要因の検索. *日本農芸化学会誌* **78**:764-779 (2004)

Crofts A. J., H. Washida, T. W. Okita, T. Kumamaru and H. Satoh.: Targeting of proteins to ER-derived compartments in plants: The importance of RNA localization. *Plant Physiol.* **136**: 3414-3419 (2004)

荒巻 功・菊永雪絵・吉井美華・奥田将生・小関卓也・小川雅広・熊丸敏博・佐藤光・橋爪克己: 心白を持つ胚乳変異体の構造観察と酒造適性分析. *日本醸造協会誌*, **99**(2), 134-144 (2004)

荒巻 功・神田涼子・菊永雪絵・吉井美華・岩田博・奥田将生・小関卓也・小川雅広・熊丸敏博・佐藤光・橋爪克己: 心白を持つ胚乳変異体の粘度及び糊化特性と清酒醸造試験. *日本醸造協会誌*, **99**(3), 189-201 (2004)

Ueda Y., H. Satoh, M. Sato, Y. Takemoto, T. Kumamaru, and M. Ogawa: Inheritance mode of *Glup5* gene and the genetic relationships with other 57H mutant genes. *Rice Genetics Newsletter* **21**: 49-51 (2004)

Ueda Y., A. Sugino, Y. Takemoto, M. Sato, T. Kumamaru, M. Ogawa, and H. Satoh. : A novel 57H mutant gene, *glup7*, located on chromosome 4. *Rice Genetics Newsletter*, **21**: 51-54 (2004)

B. データベース等

イネ保存系統データベース

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

土居克実, 西崎陽祐, 大桃定洋, 緒方靖哉. 分子系統解析による西南暖地型サイレージ乳酸菌株の多様性の究明, *生物工学会誌*, **82**, 436-438 (2004)

B 著書・総説

原敏夫: 大学発ベンチャーで納豆樹脂はブレイクするか? *未来材料* **4**, 68-73 (2004)

土居克実、稲垣史生、緒方靖哉: *Thermus*属細菌によるシリカ鉱物化作用- 地球で最も多い元素と好熱性細菌との接点を探る- *生物と化学*, **42**, 326-332 (2004)

C プロシーディングス・報告書他

T. Hara 大学発ベンチャーで納豆樹脂はブレイクするか? 第三回国際バイオエキスポ: 15-19 (2004)

Doi, K. Biotechnological Use of Genetic Resources in Japan: Japan-Croatia

Science and Technology Exchange Workshop, 5-6, Zagreb, Croatia (2004)

Doi, K., Nitisinprasert, S. and Ogata, S. : Thermotolerant enterocin SE-K4, an anti-listerial bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* K-4 isolated from silage in Thailand, The 4th joint seminar on development of thermotolerant microbial resources and their applications, 95, Fukuoka, Japan (2004)

土居克実、緒方靖哉、大桃定洋: 微生物を利用した環境保全型農畜産システムの開発～サイレージ発酵を中心に安全・安価な持続的循環型畜産を目指して～九州・沖縄地域の農林水産分野における環境研究の最新情報, 125-129 (2004)

江口吾朗、渡邊一雄、野田正彦、土居克実、所健児、福田佳也乃: 「ライフサイエンス分野の成果報告書」科学技術振興機構研究開発戦略センター、1-18 (2004)

原敏夫: 大学発ベンチャー(有)ハラテック 地域新生コンソーシアム研究開発制度を活用した九州における実用化技術開発の現状と成果事例集 (九州経済産業局編) p.28 (2004)

原敏夫: 有限会社ハラテック 四国・九州地域における大学発ベンチャー創出・成長支援に関する調査 (九州経済産業局編) p.79-80 (2004)

原敏夫 有限会社ハラテック 九州地域大学発ベンチャー事例集 (九州経済産業局編) p.42-43 (2004)

原敏夫 納豆の“ネバネバ”が保湿ジェルに! 日経トレンディ 5月号, p.39 (2004)

原敏夫 研究室発ビジネスシーズ1「納豆樹脂で環境リサイクル関連商品を開発」九州経済調査月報 8月号 p.26-31 (2004)

原敏夫 納豆樹脂 プレジデント 12月号 p.146 (2004)

2. 原著論文要旨

家蚕遺伝子開発分野

Genome 47: 96–101 (2004)

doi: 10.1139/G03-112

© 2004 NRC Canada

M chromosome of the wild silkworm, *Bombyx mandarina* ($n = 27$), corresponds to two chromosomes in the domesticated silkworm, *Bombyx mori* ($n = 28$)

Yutaka Banno, Takashi Nakamura, Eiichi Nagashima, Hiroshi Fujii,
and Hiroshi Doira

Abstract: Chromosomes of *Bombyx mori* ($n = 28$) and of *Bombyx mandarina* ($n = 27$) were studied cytogenetically to resolve the origin of the large M chromosome in the Japanese type of *B. mandarina*. In the F_1 progeny from the reciprocal cross between *B. mandarina* and *B. mori*, the mitotic chromosome number was $2n = 55$, and a chromosome configuration of 26 bivalents plus 1 trivalent was observed at metaphase I of germ cells. The trivalent chromosome consisted of the M chromosome from *B. mandarina* and two chromosomes from *B. mori*. When males of *B. mori* were mated to the F_1 females, nuclei with two types of chromosome number ($2n = 55$ and $2n = 56$) and two sets of chromosome pairs (26 bivalents plus 1 trivalent versus 28 bivalents) were observed in the metaphase I stage. Linkage analysis showed that the 14th chromosome of *B. mori* was involved in these two types of chromosome segregation. This result indicates that the M chromosome in *B. mandarina* arose from a fusion between a chromosome corresponding to the 14th linkage group and another, yet unidentified linkage group.

Key words: *Bombyx mandarina*, *Bombyx mori*, chromosome dimorphism, linkage, karyotype.

Résumé : Les chromosomes du *Bombyx mori* ($n = 28$) et du *Bombyx mandarina* ($n = 27$) ont fait l'objet d'une étude cytogénétique pour déterminer l'origine du grand chromosome M présent chez les types japonais du *B. mandarina*. Au sein de la progéniture F_1 d'un croisement réciproque entre le *B. mandarina* et le *B. mori*, le nombre de chromosomes mitotiques était $2n = 55$ et ceux-ci formaient 26 bivalents et un trivalent à la métaphase I (MI) dans les cellules germinales. Le trivalent était formé du chromosome M du *B. mandarina* et de deux chromosomes du *B. mori*. Lorsque des mâles du *B. mori* ont été croisés à des femelles F_1 , des noyaux avec deux contenus chromosomiques ($2n = 55$ ou $2n = 56$) et deux conformations (26 bivalents + 1 trivalent ou 28 bivalents) ont été observés en MI. Une analyse de liaison a montré que le quatorzième chromosome du *B. mori* était impliqué dans ces deux types de ségrégations chromosomiques. Ce résultat indique que le chromosome M du *B. mandarina* serait le fruit d'une fusion entre un chromosome correspondant au quatorzième groupe de liaison et un autre chromosome non encore identifié.

Mots clés : *Bombyx mandarina*, *Bombyx mori*, dimorphisme chromosomique, liaison, caryotype.

[Traduit par la Rédaction]

Introduction

The domesticated silkworm, *Bombyx mori*, which has been used as a source of silk, has lost its feral characteristics because of long-term breeding in artificial conditions. The wild silkworm, *Bombyx mandarina*, which inhabits eastern Asia, is very similar to *B. mori* in morphology and physiological characteristics (Kawaguchi 1928; Astaurov et al. 1959; Yoshitake 1968; Chikushi 1972). The two species can

be crossed with each other and the hybrid progeny is fertile. From the close relationship between the two species, it is generally believed that *B. mandarina* is the original type of the domesticated silkworm *B. mori*.

As to chromosome number, there is geographic dimorphism in *B. mandarina*. The haploid chromosome number of *B. mandarina* inhabiting China and Ussuri is $n = 28$, which is the same as that found in *B. mori* (Astaurov et al. 1959; Nakamura et al. 1999). On the other hand, *B. mandarina* in-

Received 2 May 2003. Accepted 8 October 2003. Published on the NRC Research Press Web site at <http://genome.nrc.ca> on 28 January 2004.

Corresponding Editor: W. Traut.

Y. Banno,¹ T. Nakamura, H. Fujii, and H. Doira. Institute of Genetic Resources, Kyushu University Graduate School of Bioresource and Bioenvironmental Sciences, Hakozaki 6-10-1, Fukuoka, 812-8581, Japan.
E. Nagashima. Faculty of Textile Science and Technology, Shinshu University, Tokida, 3-15-1, Ueda, 386-8567, Japan.

¹Corresponding author (e-mail: banno@agr.kyushu-u.ac.jp).

Integration of molecular and classical linkage groups of the silkworm, *Bombyx mori* ($n = 28$)

Yuji Yasukochi, Yutaka Banno, Koichi Yamamoto, Marian R. Goldsmith, and Hiroshi Fujii

Abstract: Previously published linkage groups (LGs) composed of molecular markers were assigned to classical LGs in the silkworm, *Bombyx mori* ($n = 28$). Four markers from the classical linkage map, *og*, *w-1*, *Lp*, and *Pfl*, were assigned to the molecular linkage maps using sequence tagged sites. In addition, linkage analysis was carried out using BF_1 progeny between wild-type and mutant stocks carrying morphological phenotypic markers. As a result, the counterparts for 26 of 28 molecular LGs were identified with their counterparts of the classical LGs. Two visible markers, *Sel* and *Xan*, representing different classical LGs, were found to be linked.

Key words: *Bombyx mori*, classical linkage group (LG), PCR-based genotyping, mutant, STS.

Résumé : Des groupes de liaison, composés de marqueurs moléculaires et publiés antérieurement, ont été assignés à des groupes de liaison classiques chez le vers à soie, *Bombyx mori* ($n = 28$). Quatre marqueurs de la carte classique, *og*, *w-1*, *Lp* et *Pfl*, ont été assignés aux cartes moléculaires en exploitant des sites de séquence connue. De plus, une analyse de liaison a été réalisée avec des descendance BF_1 issues de croisements entre un type sauvage et des lignées mutantes portant des marqueurs phénotypiques. Grâce à ce travail, la correspondance entre 26 des 28 groupes de liaison moléculaires et leurs pendants classiques a été établie. Deux marqueurs visibles, *Sel* et *Xan*, situés sur 2 groupes de liaison sur la carte classique se sont avérés liés.

Mots clés : *Bombyx mori*, groupes de liaison classiques, génotypage par PCR, mutant, STS.

[Traduit par la Rédaction]

Introduction

The domesticated silkworm, *Bombyx mori* ($n = 28$), is one of the most intensively analyzed non-dipteran insects in genetics and genomics. Recent progress in genome sequencing using whole-genome shotgun clones (Mita et al. 2004; Xia et al. 2004) has greatly improved the usefulness of *B. mori* as a model organism. More than 400 genetic traits have been identified and assigned to 28 classical linkage groups (LGs) (Doira 1986; Fujii et al. 1998). In addition, several linkage maps based on molecular markers have been constructed (Promboon et al. 1995; Shi et al. 1995; Yasukochi 1998; Tan et al. 2001). However, with few exceptions, the relationships between molecular and classical LGs have not been identi-

fied. This is necessary for optimal utilization of the information accumulated in classical genetics and practical breeding, and for future positional cloning of mutant genes of interest.

Materials and methods

We previously established 28 molecular LGs, mainly composed of RAPDs, that correspond to the 27 autosomes and the Z chromosome of *B. mori* (Yasukochi 1998, 1999). We assigned 12 of them to the classical LGs using sequence tagged sites (STS) and visible markers (Table 1). In the present study, we addressed the identification of the remaining 16 molecular LGs by 2 strategies. (i) We genotyped the original F_2 population used for RAPD-map construction using STS for markers assigned to 4 of the remaining classical LGs whose underlying genes were previously identified. (ii) We also carried out a series of F_1 female informative backcrosses between standard wild-type stocks and a set of mutant silkworm strains carrying visible markers for the 12 remaining unidentified LGs.

Four markers of the classical linkage map, *og* (*oily g*), *w-1* (*white-1*), *Lp* (*Lipoprotein*), and *Pfl* (*Larval female protein*), were used for the 1st set of assignments, since nucleotide sequences of the genes associated with these phenotypes were previously determined. A mutation of a molybdenum cofactor sulfuryase gene is thought to cause *og* (LG 9), 1 of ~20 translucent larval skin mutations (Komoto et al. 2003). The egg color laid by *w-1* (LG 10) is white, and polymorphisms of the kynurenine 3-monooxygenase gene cosegregate with *w-1* (Quan et al. 2002). *Lp* (LG 20) and *Pfl* (LG 23) were

Received 6 December 2004. Accepted 10 March 2005.
Published on the NRC Research Press Web site at
<http://genome.nrc.ca> on 6 August 2005.

Corresponding Editor: W. Traut.

Y. Yasukochi,¹ Insect Genome Laboratory, National Institute of Agrobiological Sciences, Tsukuba, Ibaraki 305-8634, Japan.

Y. Banno, K. Yamamoto, and H. Fujii, Kyushu University, Graduate School of Bioresource and Bioenvironmental Science, 6-10-1 Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka 812-8581, Japan.

M.R. Goldsmith, Biological Sciences Department, 100 Flagg Road, University of Rhode Island, Kingston, RI 02881-0816, USA.

¹Corresponding author (e-mail: yaskoch@affrc.go.jp).



ELSEVIER

Available online at www.sciencedirect.com



Protein Expression and Purification 38 (2004) 9–16

Protein
Expression
& Purification

www.elsevier.com/locate/yprep

Overexpression in *Escherichia coli* and purification of recombinant CI-b1, a Kunitz-type chymotrypsin inhibitor of silkworm[☆]

Ningjia He^a, Hiroshi Fujii^{a,*}, Takahiro Kusakabe^b, Yoichi Aso^c,
Yutaka Banno^a, Kohji Yamamoto^a

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

^b Laboratory of Silkworm Science, Faculty of Agriculture, Kyushu University, 6-10-1, Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka 812-8581, Japan

^c Protein Chemistry and Engineering, Faculty of Agriculture, Kyushu University, 6-10-1, Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka 812-8581, Japan

Received 1 February 2004, and in revised form 18 May 2004

Available online 28 August 2004

Abstract

Present research provided an efficient approach to obtain large quantities of active recombinant CI-b1, a Kunitz-type chymotrypsin inhibitor of silkworm, *Bombyx mori*. The cDNA encoding mature CI-b1 was cloned into pDEST17 vector. Recombinant protein with hexa-histidine tag attached to the N-terminal of CI-b1 was expressed in *Escherichia coli* Origami B cells. It can be purified to homogeneity via the gel filtration chromatography on a Sephacryl S-200 column followed the affinity chromatography on a Ni-NTA column. The two sequential purification procedures yielded 4.3 mg purified (His)₆-tagged CI-b1 from 200 ml of culture medium. Studies on (His)₆-tagged CI-b1 revealed that three disulfide bonds were formed in the recombinant CI-b1 and the inhibitory properties of recombinant CI-b1 against α -chymotrypsin were similar to those of native CI-b1. Recombinant CI-b1 immobilized on Ni-NTA resin was used to detect the interactions occurring between the CI-b1 and its target factors.

© 2004 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Chymotrypsin inhibitor; Silkworm; Expression; *Escherichia coli*

CI¹-b1 is a protease inhibitor consisting of 62 amino acid residues isolated from the hemolymph of silkworm, *Bombyx mori* [1]. It was designated for its inhibitory activity against α -chymotrypsin and its basic isoelectric point [2]. This peptide is considered physiologically

important because the deficiency of CI-b1 is inconsistent with the life of silkworm. In our previous studies, we cloned it at the cDNA and genomic levels and discovered that the expression of CI-b1 could respond transcriptionally to the intrusion of *Escherichia coli*, suggesting that this inhibitor played a role in the immune responses of silkworm [3]. Recent evidences further indicated that CI-b1 was a lipopolysaccharide (LPS) binding protein. It was speculated as a mediator that scavenges intruding bacteria rather than a direct anti-bacterial factor [4].

The sequence analyses indicate that CI-b1 is a Kunitz-type inhibitor, having three disulfide bonds formed by six-well conserved cysteine residues [5]. These kind of inhibitors exhibit inhibitory activity against the common serine proteases such as trypsin, chymotrypsin, or thrombin, and then devoid of their enzymatic activities

[☆] The cDNA sequences of CI-b1 can be retrieved from the GenBank under the Accession No. AF361484.

* Corresponding author. Fax: +81 92 624 1011.

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

¹ Abbreviations used: CI, chymotrypsin inhibitor; LPS, lipopolysaccharide; Ni-NTA, Ni²⁺-nitriloacetic acid; LB, Luria-Bertani; IPTG, isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis; PCR, polymerase chain reaction; PMSF, phenylmethylsulfonyl fluoride; BSA, bovine serum albumin; HRP, horseradish peroxidase; TFA, trifluoroacetic acid; CHCA, α -Cyano-4-hydroxy cinnamic acid; CBB, Coomassie brilliant blue R250.



Communication

Proteomic Studies of Lipopolysaccharide-induced Polypeptides in the Silkworm, *Bombyx mori*

Yongqiang WANG,^{1,3} Pingbo ZHANG,¹ Hiroshi FUJII,^{1,†} Yutaka BANNO,¹
Kohji YAMAMOTO,¹ and Yoichi ASO²

¹Laboratories of Insect Genetic Resources, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Fukuoka 812-8581, Japan

²Genetic and Protein Engineering, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Fukuoka 812-8581, Japan

³Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, China

Received February 16, 2004; Accepted June 24, 2004

Silkworm larvae at the 5th instar were injected with lipopolysaccharide from *Escherichia coli* and inducible polypeptides were examined within a pI range of 3–10 and a size range of 14–97 kDa by proteomics, including peptide mass fingerprinting. No polypeptides were induced in the midgut. FB1 and H1–4 polypeptides were significantly induced in fat body and hemolymph, respectively. FB1 and H1 were estimated to be anti-trypsin and serpin-2 proteinase inhibitors respectively. H2 and H3 were novel polypeptides. H4 was estimated to be attacin antibacterial polypeptide with high coverage of sequence. The amounts of all the induced polypeptides decreased at 48 h after the injection.

Key words: proteomics; silkworm; peptide mass fingerprinting; lipopolysaccharide; attacin

Insects have specific defense systems to protect themselves from microbial invasion. They are called innate immunity.^{1–3} Invasion by bacteria induces a variety of antibacterial polypeptides and triggers proteinaceous interactions.⁴ Attacin, cecropin, lebocin, and moricin are antibacterial polypeptides induced in the silkworm, *Bombyx mori*. These polypeptides are induced when the silkworm larvae are injected with lipopolysaccharide (LPS) from *Escherichia coli*.⁵ In comparison with knowledge from genomic studies of antibacterial polypeptides, however, we still know little about the extensive changes in inducible polypeptides upon bacterial infection. To identify diverse polypeptides rapidly and to monitor changes in them, the proteomics by peptide mass fingerprinting (PMF) method using two-dimensional gel electrophoresis (2-DE), in-gel tryptic digestion, matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS), and database searching is one of the most powerful tools.^{6,7} Proteomic studies are also important to avoid overlooking unexpected changes due to researcher's a

priori limitations. Traditional studies of antibacterial responses have tended to focus on the induction and transport of a specific polypeptide. In this study, we injected *E. coli* LPS into silkworm larvae and examined the changes in polypeptides in the hemolymph, fat body, and three portions of the midgut comprehensively by the PMF method. Over pI and molecular mass ranges between pI 3 and 10 and between 14 and 97 kDa, respectively, we compared changes in polypeptides under a challenged condition with those under a naive one. As described below, we found insignificant changes in the midgut and significant changes in the hemolymph and fat body.

The silkworms used were *B. mori* larvae (p50 strain) maintained and reared on mulberry leaves at the Institute of Genetic Resources of Kyushu University (Fukuoka, Japan). The LPS from *E. coli* serotype O55:B5 was purchased from Sigma (Tokyo, Japan) and injected into at least 10 female larvae at day 3 of the 5th instar. 20 μ l each of 50 mM phosphate buffer saline (pH 7) containing 20 μ g of LPS was injected. Hemolymph and tissues were sampled from the larvae immediately (0 h) and at given times (24 h and 48 h) after injection. All procedures to prepare samples were done at 4 °C. The hemolymph (about 40 μ l from each larva) was collected with microcapillaries onto solid 1-phenyl-2-thiourea and hemocyte was removed by centrifugation at 2,000 \times g for 5 min. Fat body and the anterior, middle, and posterior midguts were dissected from the larvae in 0.13 M NaCl and blotted on filter paper. All samples thus prepared were frozen with liquid N₂ and stored at –80 °C until extraction of polypeptides. Buffer A was composed of 8 M urea, 2 M thiourea, 4% (w/v) 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate, 0.03 M dithioerythritol, and 2% (v/v) pH 3–10 Pharmalyte (Amersham Biosciences). The frozen samples were thawed and suspended in buffer A which contained 20 mM Tris, 3 mM EDTA, 1 mM phenylmethanesulfonyl

[†] To whom correspondence should be addressed. Fax: +81-92-624-1011; E-mail: fujii@agr.kyushu-u.ac.jp

Abbreviations: LPS, lipopolysaccharide; MALDI-TOF MS, matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry; PMF, peptide mass fingerprinting; 2-DE, two-dimensional gel electrophoresis

Inheritance of a Body Shape Mutant Named "Short Segment" of the Domesticated Silkworm, *Bombyx mori*

Yutaka Banno*, Kazuhiro Nishikawa, Akihiro Nishisaka, Kei Tamura, Koji Yamamoto and Hiroshi Fujii

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

(Received, July 23, 2003; Accepted, November 3, 2003)

A dominant mutant, "Short Segment" (symbol *Seg*), was discovered as a spontaneous occurrence. Homozygotes and heterozygotes for *Seg* possess short body in length in each segment during all the larval stages. Linkage analysis showed that *Seg* was linked with *odk* and *Nl*, which had been mapped at the 32.5 and 35.2 positions, respectively, on the 14th linkage group. The *Seg* gene was precisely localized by a three-point experiment involving *odk*, *Nl*, and *Seg*. The recombination value between *odk* and *Seg* was calculated to be 0.60%, between *Seg* and *Nl* 2.51% and between *odk* and *Nl* 3.11%. Hence, the arrangement of these three gene loci on the chromosome is in the order *odk*-*Seg*-*Nl*. Taking a correction factor into account, the locus of *Seg* was determined to be 33.0 of the 14th linkage group.

Key words: *Bombyx mori*, morphogenesis, body shape, linkage, mutant, genetic analysis, gene

INTRODUCTION

In the silkworm *Bombyx mori*, several kinds of body shape mutants at the larval stage have been reported and mapped on the linkage maps (Chikushi, 1972; Fujii *et al.*, 1998). These gene mutants vary from being long (*e*, elongated: linkage group 1-36.4 cM. Tanaka, 1923; *Set*, soft and elongated: linkage group 1-35.5 cM. Kawaguci *et al.*, 1995) to short (*Obs*, Dominant obese translucent: linkage group 18-6.2 cM, Yoshimura *et al.*, 1984), and thick (*nb*, narrow breast: linkage group 19-31.2 cM, Chikushi, 1953; *tub*, tubby: linkage group 23-6.9 cM, Doira *et al.*, 1980) to thin (*st*, stony: linkage group 8-0.0 cM, Tanaka, 1919, Tazima *et al.*, 1960; *sk*, stick: linkage group 4-41.1 cM, Tanaka and Matsuno, 1927; *Lan*, Lanky: linkage group 21-17.9 cM, Doira *et al.*, 1977). In addition to these mutants, other body shape mutants have also been reported: *gn* (gooseneck: linkage groups 9-22.0 cM, Doira *et al.*, 1974), *Bo* (Bamboo: linkage groups 11-26.6 cM, Kanekatsu *et al.*, 1988), *mf* (moiliform: linkage groups 12-39.8 cM, Ninagi *et al.*, 1981), *cot* (contractile: linkage groups 15-25.0 cM, Fujii *et al.*, 1996), and *Str* (Strangulated: linkage groups 15-46.8 cM, Doira, *et al.*, 1979).

In 1998, we discovered a new mutant that showed a short body shape like the *Obs* mutant. The short body shape of the *Obs* mutant is characterized with a translucent larval skin (Yoshimura *et al.*, 1984), however, this new mutant showed the abnormality only in the body shape. This paper describes in detail the results of the ge-

netic analysis of this new mutant.

MATERIALS AND METHODS

The new mutant was discovered in the silkworm strain fl2, which has an *E^w* (new additional crescent) gene, one of the *E* multiple alleles (mapped to the 21.1 position of the 6th linkage group: Itikawa, 1943). The fl2 strain had been supplied by the National Institute of Genetics, Japan in 1972 and had been maintained thereafter in Kyushu University (Fujii *et al.*, 1998). Linkage analysis of the mutant was made by using the autosomal marker genes *Y*(2), *L*(4), *E^w*(6), *Ia*(9), *K*(11), *U*(14), *bl*(15), *cts*(16), *Xan*(27), and *E-tr*(?). Each number in the 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 × marker males. When a dominant marker gene was used, segregation was examined in the cross: F₁ female × normal type males. A three-point test was done as described below.

RESULTS AND DISCUSSION

Discovery and establishment of "Short Segment"

We discovered that one short segment larvae (male) segregated with 200 normal larvae in the fl2 strain during the course of the examination of the larval characters of all strains in our institute in the spring of 1998. The larval phenotype of the body shape in the fl2 strain has been characterized as normal with the *E^w* (new additional crescent) gene. As other traits were same to those recorded in the fl2, this mutant seems to not be a contaminant. This abnormal male was crossed with a female of the w41

*To whom correspondence should be addressed.

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

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



In Vivo and in Vitro Interactions of the *Bombyx mori* Chymotrypsin Inhibitor b1 with *Escherichia coli*

Ningjia HE,¹ Yoichi Aso,² Hiroshi FUJII,^{1,†} Yutaka BANNO,¹ and Kohji YAMAMOTO¹

¹Laboratories of Insect Genetic Resources, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Fukuoka 812-8581, Japan

²Protein Chemistry and Engineering, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Fukuoka 812-8581, Japan

Received October 31, 2003; Accepted January 12, 2004

Various chymotrypsin inhibitors occur in the hemolymph of silkworm larvae. Interaction of chymotrypsin inhibitor b1 (CI-b1) with *Escherichia coli* was examined from the viewpoint of action against invading bacteria. Injection of dead *E. coli* cells into larva reduced the CI-b1 content of the hemolymph, suggesting *in vivo* binding of CI-b1 to the outer membrane of the cell. Results from incubation of *E. coli* in cell-free hemolymph in the presence or absence of lipopolysaccharide indicated that CI-b1 is the only CI bound to *E. coli* and that it interacts with lipopolysaccharide. CI-b1 formed a complex with lipopolysaccharide *in vitro*; the value of the dissociation constant was relatively large. Inhibitory activity of CI-b1 changed insignificantly in mixture with lipopolysaccharide. CI-b1 affected the growth of *E. coli* but never worked lethally. CI-b1 is speculated to be a mediator that scavenges intruding bacteria rather than a direct anti-bacterial factor. This is the first report confirming that CI-b1 is a lipopolysaccharide binding protein.

Key words: chymotrypsin inhibitor; silkworm; lipopolysaccharide (LPS); *Escherichia coli*; hemolymph

In invertebrates, there is no adaptive immunity system but rather an innate immune system against invading pathogens; pattern recognition proteins initiate innate immune responses.^{1,2} The pattern recognition proteins bind to lipopolysaccharide (LPS), lipoteichoic acid, and β -1,3-glucan on the surface of a bacterium or fungus, and are thus capable of discriminating self-molecule from non-self molecule. The proteins then trigger a variety of humoral and cellular responses such as hemolymph coagulation, induction of anti-microbial peptide, phagocytosis, and encapsulation.³ A large number of proteases are involved in the innate immunity of invertebrates.^{4,5} The activities of some proteases have been reported to be regulated by endogenous inhibitors.^{6,7} A variety of protease inhibitors showing

inhibitory activity against chymotrypsin occur in larval hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*; chymotrypsin inhibitor (CI) is a general term for these inhibitors.⁸ Biochemical and genetic properties of CIs have been reported.^{9–14} But there exists a quite insufficient knowledge of the physiological roles of CI. CI-b1 is a Kunitz-type CI with a basic pI.¹⁵ Recently we reported that the promoter region of the CI-b1 gene has NF- κ B and GATA DNA binding motifs that play important roles in the regulation of the insect immune-related gene and that the expression of the CI-b1 gene responds transcriptionally to the injection of LPS and dead *Escherichia coli*.¹⁶ In this context, our research has focused on the interaction between CI-b1 and *E. coli* cells. This paper reports that CI-b1 is a novel LPS binding protein having less anti-bacterial activity.

Materials and Methods

Insect, hemolymph, bacteria, and chemicals. Silkworm larvae (p50 strain) maintained at the Institute of Genetic Resources at Kyushu University were reared on mulberry leaves. Hemolymph collected from larvae at 4 °C was centrifuged at 3,000 \times g for 10 min to remove hemocyte, and resulting supernatant was used immediately. *E. coli* serotype K12:DH5 α and formaldehyde-treated dead cells were gifts from Dr. S. Shimizu (Kyushu University). LPS from *E. coli* serotype O55:B5 and Alexa Fluor 488 derivative (AF-LPS) of the LPS were purchased from Sigma (Tokyo, Japan) and Molecular Probes (Eugene, USA), respectively. α -Chymotrypsin and *N*-acetyl-DL-phenylalanine β -naphthyl ester (APNE) were obtained from Nacalai Tesque (Kyoto, Japan). All other chemicals were of analytical grade for biochemical use.

Assay of inhibitory activity, electrophoresis, and activity staining. Inhibition of chymotrypsin catalyzing the digestion of casein was measured by the method

[†] To whom correspondence should be addressed. Fax: +81-92-624-1011; E-mail: fujii@agr.kyushu-u.ac.jp

Abbreviations: AF, Alexa Fluor; APNE, *N*-acetyl-DL-phenylalanine β -naphthyl ester; BmLBP, *Bombyx mori* LPS-binding protein; CI, chymotrypsin inhibitor; GNB, Gram negative bacteria binding protein; LB, Luria-Bertani; LPS, lipopolysaccharide; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis; PBS, phosphate buffer saline; SDS-PAGE, sodium dodecylsulfate PAGE

Purification and Characterization of Chymotrypsin Inhibitor CI-3 from Hemolymph of Silkworm, *Bombyx mori*

Qiaoling ZHAO¹, Ningjia HE², Koji SHIRAI², Hiroshi FUJII^{2*},
Yutaka BANNO², and Kohji YAMAMOTO²

Institute of Genetic Resources, Faculty of Agriculture,
Kyushu University, Fukuoka 812–8581, Japan

(Received October 31, 2003 and accepted November 14, 2003)

The chymotrypsin inhibitor 3 (CI-3) whose expression is controlled by *Ict-E* gene on the 22nd linkage group was purified from the larval hemolymph of silkworm *Bombyx mori* by combination of a series of column chromatography and polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of sodium dodecyl sulfate (SDS-PAGE). The molecular weight of CI-3 was 40 kDa and its isoelectric point was 5.5. The results of analysis on the protein properties revealed that the inhibitory activity of CI-3 against α -chymotrypsin was remarkably stable at pH 6.9–10.6, but lost 30% and 70% of the inhibitory activity at pH 5.9 and pH 11.9, respectively. CI-3 was quite stable at the temperature between 0°C to 50°C and lost inhibitory activity completely at the temperatures higher than 60°C. CI-3 showed strong inhibitory activity toward α -chymotrypsin and silkworm digestive juice (DJ) protease.

Key Words: *Bombyx mori*; hemolymph; chymotrypsin inhibitor; protein purification

INTRODUCTION

Protease inhibitors are widely found in animals, plants and microbes (Sato and Murano, 1973; Yoshimoto and Laskowski, 1982; Brizin *et al.*, 1984; Taguchi *et al.*, 1994). They have recently been extensively studied since they involved in regulation of other functional proteins, protection tissues from harmful proteases and prevention of invading proteases (Kurioka *et al.*, 1999; Yoshimoto *et al.*, 1982; Narayanaswamy *et al.*, 1988).

According to the electrophoretic mobility in polyacrylamide gel, there are at least 16 chymotrypsin inhibitors (CIs) in the larval hemolymph of silkworm, *Bombyx mori*. These CIs are classified into three groups and are controlled by *Ict-A*, *Ict-D*, and *Ict-E* genes located on the 2nd, 19th and 22nd linkage group, respectively (Fujii *et al.*, 1989, 1996a; Deng *et al.*, 1990; Shinohara *et al.*, 1993). The first group including CI-9, -10, -13, -13', -1, -2, -2', -b1 and -b2, controlled by *Ict-A* gene, is Kunitz-type CIs with low molecular weight. While the *Ict-D* gene is responsible for the production of CI-6, -7, and -8 which are Serpin-type CIs with an oligosaccharide chain and molecular mass of 42 kDa. (Shirai *et al.*, 1997). These protease inhibitors have been purified, characterized, and the studies on their functions are in progress. It is worthwhile to note that the genomic structures of CI-13 and CI-b1 have been clarified and CI-b1 was confirmed as an immune-related gene (He *et al.*, 2003). In addition, it was found that CI-8, once secreted

¹ Sericultural Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhenjiang 212018, China;

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

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



Utility of Dry Gel from Two-dimensional Electrophoresis for Peptide Mass Fingerprinting Analysis of Silkworm Proteins

Pingbo ZHANG,¹ Kohji YAMAMOTO,¹ Yongqiang WANG,¹ Yutaka BANNO,¹ Hiroshi FUJII,^{1†} Fumio MIAKE,² Nobuhiro KASHIGE,² and Yoichi Aso³

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

²Microbiology Laboratory, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Fukuoka University, Fukuoka 814-0181, Japan

³Laboratory of Genetic and Protein Engineering, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Fukuoka 812-8581, Japan

Received June 7, 2004; Accepted July 16, 2004

We compared the use of wet and dry two-dimensional electrophoresis (2-DE) gels for in-gel tryptic digestion and subsequent analysis by mass spectrometry, first using bovine serum albumin (BSA) as a model protein and then using unknown proteins from an extract of the silkworm midgut. The gel was either dried at 80 °C or left wet. Upon analysis of BSA, there was little difference in peptide recovery from 2-DE or in mass spectrum between the dry and the wet gels. The midgut extract was resolved into more than 1,100 protein spots by 2-DE, and 40 of these spots were sampled for further analysis. For all of the 40 proteins, the results obtained from dry and wet gels were quite similar in mass spectra and protein identification, although the relative amounts of peptides from tryptic digestion ranged from 45 to 146%. Based on these results, we confirmed the utility of dry electrophoretic gels for proteomics of insect extracts.

Key words: dry gel; silkworm; two-dimensional gel electrophoresis; mass spectrometry

The physiology of an insect is greatly altered during development from the embryo to the adult. For example, the complete metamorphosis exhibited by an insect such as the silkworm involves drastic changes. Many researchers have made an effort to answer questions about how physiological and biochemical mechanisms are responsible for these changes. A variety of factors involved in the changes are, however, dependent on tissue and/or time. A thorough understanding of these mechanisms requires comprehensive study. In this context, proteomics by the peptide mass fingerprinting (PMF) method using two-dimensional electrophoresis (2-DE), in-gel digestion with trypsin, matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS), and database searching is one of the more powerful tools used to identify various

proteins rapidly and to monitor their changes.^{1–5)} After 2-DE of a sample, PMF is usually continued using an intact wet gel. In general, a complete analysis rarely requires only a single gel from a 2-DE, and many gels are usually required from a series of 2-DE; analysis of trace amounts of protein also requires many gels from repeated 2-DEs of identical samples. It is thus worthwhile to consider drying the wet gel and storing it as a dry gel. The dry gel is more suitable for long-term storage to avoid contamination, and is more easily handled. In addition, a dry gel is less fragile than a wet gel. The use of dry gels thus improves the efficiency of proteomics by the PMF method. For example, silver-stained protein bands in dry gel were reported to be analyzed even after storage for several years.⁶⁾ There are a few reports dealing with the validity of using a dry gel.^{7,8)} Nevertheless, from these reports, we were able to acquire only a limited knowledge of drying effects, such as unfavorable chemical modifications. Practical use of a dry gel, therefore, requires detailed comparison of the results obtained from dry and wet gels at various steps. The aim of the present study was to confirm the utility of dry gel by examining any deviations from the use of wet gel. For this study, bovine serum albumin (BSA) was used as a standard protein, while an extract from the silkworm (*Bombyx mori*) midgut was used as a mixture of unknown proteins.

Materials and Methods

Reagents. Unless otherwise noted, all chemicals were of the highest analytical grade. Pharmalyte Immobiline DryStrip (18 cm, pH 3–10) and Pharmalyte (pH 3–10) were from Amersham Pharmacia Biotech AB (Uppsala, Sweden). A Sequazyme peptide mass standard kit was obtained from PerSeptive Biosystems (Framingham, Massachusetts, U.S.A.). Reductively methylated porcine trypsin was of sequencing grade from Promega (Man-

[†] To whom correspondence should be addressed. Fax: +81-92-624-1011; E-mail: fujii@agr.kyushu-u.ac.jp

Abbreviations: BSA, bovine serum albumin; MALDI-TOF MS, matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry; PMF, peptide mass fingerprinting; 2-DE, two-dimensional gel electrophoresis

心白を持つ胚乳変異体米の構造観察と酒造適性分析 (第1報)

荒巻 功*・菊永雪絵¹・吉井美華・奥田将生・小関卓也・小川雅広¹

熊丸敏博²・佐藤 光²・橋爪克己

((独)酒類総合研究所・¹山口県立大学生活科学部・²九州大学農学研究院遺伝子資源工学部門・

* 現所属：高松国税局)

平成 15 年 9 月 8 日受理

Observation of the Endosperm-mutant Rice Grains having a White Core (Shinpaku) and Analysis of Their Physical and Chemical Properties for Sake Brewing

Isao ARAMAKI, Yukie KIKUNAGA¹, Mika YOSHII, Masaki OKUDA, Takuya KOSEKI, Masahiro OGAWA¹, Toshihiro KUMAMARU², Hikaru SATO², and Katsumi HASHIZUME

(National Research Institute of Brewing, 3-7-1, Kagamiyama, Higashi-Hiroshima 739-0046 ;

¹ Department of Life Science, Yamaguchi Prefectural University, Sakurabatake, Yamaguchi 753-8502 ;

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

The characteristics of a white-core (shinpaku) shape, assembly form of elongated endosperm cells, and the structure of endosperm cells of rice grain samples, including sixteen lines of endosperm-mutant which have a white-core structure, were examined by a stereoscopic or scanning electron microscope. Their physical and chemical properties for sake brewing were also analyzed. Seven types of the white-core shape, two types of the assembly form of the elongated endosperm cells, and six types of the amyloplast structure were observed among the samples. Rice samples whose central parts mainly consisted of slender-type elongated endosperm cells absorbed significantly more water than the samples consisting of radially elongated endosperm cells. A weak relationship between the type of the amyloplast structure and the digestibility (Brix) was observed. Rice samples with a small white-core area showed rather low α -amylase activities. No distinct relationship between the contents of crude protein, minerals, or the amylose of rice grain samples and the types of white cores, or the structure of amyloplasts was observed. The content of the phosphorus showed a significant correlation with either water absorption (20 min ; $r = -0.667$ and 120 min ; $r = -0.635$) or the content of crude protein ($r = 0.811$). The content of amylose showed a significant correlation with water absorption (20 min ; $r = -0.745$, 120 min ; $r = -0.725$, and after steaming ; $r = -0.681$).

Key words : 心白, 胚乳変異体米, 酒造適性

緒 言

清酒製造に使用する専用米を、清酒製造業界では「清酒製造の原料として好適である米」という意味で「酒造好適米」(以下、「好適米」という。)と称している¹⁾。これら好適米は、我々が通常食している米とは

異なる性質を示し、特に形態的には「心白」という特殊な胚乳構造を有している²⁾。このため、農林水産省の農産物規格規程においても、好適米は、食用米である「水稻うるち玄米」の規格とは別に「醸造用玄米」としての規定が定められている³⁾。これまでに、好適米と食用米の酒造適性に関する比較は、多くの研究が

心白を持つ胚乳変異体米の粘度及び糊化特性と清酒醸造試験 (第2報)

荒巻 功*・神田涼子¹・菊永雪絵¹・吉井美華・岩田 博・奥田将生

小関卓也・小川雅広¹・熊丸敏博²・佐藤 光²・橋爪克己

((独)酒類総合研究所・¹山口県立大学生活科学部・²九州大学農学研究院遺伝子資源工学部門・

*現所属：高松国税局)

平成 15 年 9 月 8 日受理

Pasting and Gelatinization Properties of Endosperm-mutant Rice Grains Having a White Core (Shinpaku) and Analysis of their Suitability for Sake Brewing

Isao ARAMAKI, Ryoko KANDA¹, Yukie KIKUNAGA¹, Mika YOSHII

Hiroshi IWATA, Masaki OKUDA, Takuya KOSEKI, Masahiro OGAWA¹

Toshihiro KUMAMARU², Hikaru SATO² and Katsumi HASHIZUME

(National Research Institute of Brewing, 3-7-1, Kagamiyama, Higashi-Hiroshima 739-0046 ;

¹Department of Life Science, Yamaguchi Prefectural University, Sakurabatake, Yamaguchi 753-8502 ;

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

The pasting and gelatinization properties of rice grain samples, including sixteen lines of endosperm-mutant which have a white-core (shinpaku) structure, were examined by Rapid Visco Analyzer (RVA) and by differential scanning calorimetry (DSC). Their suitability for sake brewing was also analyzed. The gelatinization enthalpy of the samples that have sugary-like endosperm in the white-core section showed rather smaller values, while no other obvious relationship between the RVA or DSC parameters and the types of white-core or endosperm cell structures was observed. The RVA and DSC parameters showed high correlations with some of the analytical parameters for sake brewing or with the content of amylose in the rice grains. In the sake making test of six mutant samples, it was observed that the location of the white-core parts in the rice grain affected the fermentation velocity in the early stage because of their good digestibility. In addition, the sample that had a sugary-like amyloplast structure showed high digestibility in the sake mash. Some of the tested mutant samples showed better suitability for sake brewing than the parents or *Yamadanishiki*.

Key words : 心白, 胚乳変異体米, デンプン, 清酒醸造

結 言

酒造好適米(以下「好適米」という。)の良好な特性には、心白の有無や形状が関連していると考えられており、心白は好適米を育成する際の指標の一つとなっている。心白の意義については既にいくつかの報告

があるが^{1,2,3,4,5)}、これまでの検討は心白の有無と酒造適性の良否に着目して既に選抜された優良品種を対象としたものであった。その結果、心白米が示す清酒醸造における優位性は明確になってきているが、心白米がなぜ優れた酒造特性を示すかについては未だ十分に解明されていない。そこで、我々は、食用米の突然変

PCR 法による世界の広範な特性の米の識別および食味要因の探索

中村澄子, 岡留博司, 與座宏一, 原口和朋, 奥西智哉, 鈴木啓太郎, 佐藤 光*, 大坪研一
(独立行政法人食品総合研究所, *九州大学大学院農学研究院)

平成 16 年 3 月 11 日受理

Differentiation and search for palatability-factors of world-wide rice grains by PCR method

Sumiko NAKAMURA, Hiroshi OKADOME, Koh-ichi YOZA, Kazutomo HARAGUCHI, Tomoya OKUNISHI,
Keitaro SUZUKI, Hikaru SATOH,* and Ken'ichi OHTSUBO

National Food Research Institute, Kan-nondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8642, Japan

**Faculty of Agriculture, Graduate School, Kyushu University, Hakozaki, Higasi-ku, Fukuoka 812-8581, Japan*

It is well known that rice palatability is affected by variety or cultivar and variety characteristics are mainly determined by DNA structure. In this paper, palatability estimation method for rice grains was investigated using PCR primers accumulated for cultivar identification and novel primers developed by the relationship with starch properties or protein compositions.

(1) It was shown that the proliferated DNAs by PCR, using the primers related with granule bound starch synthase (GBSS), soluble starch synthase (SSS), branching enzyme (BE), and debranching enzyme (DBE), revealed the marked differences between *japonica* and *indica* subspecies of rice. It seems to be plausible that the main component of rice grains is starch.

(2) A part of DNA sequences of glutelin gene was shown to be different between *japonica* and *indica* subspecies as a results of PCR using glutelin-related and prolamin-related primers.

(3) For the purpose of numerizing the results of PCR, discriminative DNA bands were binarized as 0 (disappeared) or 1 (appeared) and were subjected to the multiple regression analysis. Palatability estimation equations were developed using above mentioned independent variables based on the results of PCR against the dependent variables related with the palatability factors, such as amylose content, protein content, adhesiveness of cooked rice grains, and consistency of rice flours. These equations showed multiple regression coefficients of 0.92, 0.81, 0.93, and 0.84 for the calibration. Validation tests were carried out against the different rice samples and it revealed the adaptability of these estimation equations.

(Received March 11, 2004)

Key words: rice; palatability; DNA analysis; PCR; multiple regression analysis

序 論

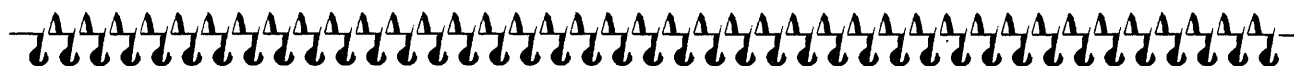
米の食味に品種が強く影響することはよく知られているが、品種特性は DNA によって規定されるため、DNA に着目した食味評価や食味推定は意味があるものと考えられる。特に、育種における良食味系統の選抜、流通加工段階での原料米の評価、またごく少量の試料による鑑定や、貿易での検査のように、評価に時間をかけられない場合に、当該試料米の特性を推定するには、DNA に基づく方法が必要とされる。

米の主成分はデンプンである。デンプンの特徴は米の品質特性に強くかかわっており、米飯の物理特性、例えば硬さや粘りに強く影響する。これまでは、デンプンのアミロース含量が最も強く特性に影響するとされており¹⁾、粳の特徴であるアミロースの形成において、顆粒結合型デンプン

ン合成酵素 GBSS (granule bound starch synthase) がアミロース形成に深くかかわっているとされている。デンプンの主要構成成分であるアミロペクチンは、 α -1,4-グリコシド結合で分子鎖を伸長する可溶性デンプン合成酵素 (soluble starch synthase; SSS) と、 α -1,6-グリコシド結合を形成して枝をつける枝作り酵素 (branching enzyme; BE) と、さらに α -1,6-グリコシド結合を切断する枝切り酵素 (debranching enzyme; DBE) が総合的に働いて合成される^{2), 3)}。米はインド型と日本型の 2 種類の亜種に分類され、そのデンプン特性も大きく異なっている。Baba らはイネの SSS 遺伝子をクローニングしてその構造を明らかにしている⁴⁾。中村らは SSSIIa がインド型米と日本型米とのアルカリ崩壊性の相違にかかわっていることを報告している⁵⁾。本研究では、SSS, BE, DBE など、デンプン合成にかかわると予想される各種の酵素に関する PCR 用プラ

3. 総説等要旨

微生物遺伝子分野



Thermus 属細菌によるシリカ鉱物化作用

地球で最も多い元素と好熱性細菌との接点を探る

土居克実*¹, 稲垣史生*², 緒方靖哉*³

*¹九州大学大学院農学研究院, *²海洋科学技術センター, *³崇城大学工学部

シリカの成分ケイ素は地球上最も多く存在する元素の一つである。熱水湧出域などの地熱環境下ではシリカスケールやシンターと言われるシリカの沈澱現象がかなり普遍的に見られる。このようなシリカ鉱物の形成はきわめて速く、無機化学的な速度論では説明が困難な現象であった。近年、シリカ沈澱現象に好熱性微生物の関与が報告され、その詳細なメカニズムが明らかになりつつある。地熱環境に生息する微生物群集は熱水化学成分をいかに利用し生息しているのだろうか。ここでは、自然界の観察と *Thermus* 属細菌を用いたモデル実験によって垣間見えてきた、原始地球より続いてきたであろうシリカと微生物の相互関係について紹介する。

地熱発電所におけるシリカスケール形成と微生物活動

シリカ (SiO_2) は地殻の約 60% を占める地球上で最も多い化合物の一つで、火成岩や砂岩の主成分である。砂浜の砂も多くがシリカ鉱物の石英である。さらに、海底では珪藻の化石が堆積してシリカに富んだ地層が形成されている。また、シリカは地下水にも高濃度含まれており、我が国の天然水では 5~100 mg/l、地下熱水 (マグマによって熱された地下水) では 400 mg/l 以上

である。水晶発振子、光ファイバーをはじめ、半導体や太陽電池などシリカの用途は広いので、このような高濃度のシリカを高純度で回収できる技術が確立されれば、重要な地球資源として今後ますます利用価値を高めることが期待できる⁽¹⁾。

シリカは、火山活動の活発な地熱地帯では、地下を移動・循環する熱水の主要な化学構成成分である。地下の高温熱水を利用する産業利用施設として地熱発電や熱水供給施設などが挙げられるが (図 1)、シリカはそれらの地熱産業に対して時に深刻な操業トラブルをもたらす。その多くの原因となるのがシリカスケール (siliceous scale) である。非結晶質シリカ (amorphous silica) が熱水輸送管やボイラーなどの陸上施設に層状に沈積した付着物であるシリカスケール (図 2-A) は、地熱発電所では、熱水輸送管の輸水効率の低下やパイプのメンテナンスなど、莫大なコストや労力の負担を強いる^(2,3)。また、熱交換器にシリカスケールが付着すると、熱交換率の低下 (シリカスケールは熱交換器や配管の材質である金属に比べ熱を伝えにくく、たとえば銅に比べて熱伝導率は約 700 分の 1 である) をもたらし、さらに、還元

分子系統解析による西南暖地型サイレージ乳酸菌株の多様性の究明

土居 克実*・西崎 陽祐・大桃 定洋・緒方 靖哉

サイレージは乳酸菌を活用した保蔵性の高い発酵粗飼料である。しかし、その発酵は開放系で行われるため、材料草に付着した乳酸菌の種類とその菌数および発酵条件が品質に大きく影響する。したがって、安定的かつ高品質なサイレージ調製のために、発酵条件の検討が行われており、近年ではサイレージスターター（種菌）の使用頻度が高まっている。有効なスターターを開発するためには、有用特性を示す乳酸菌の分離と同定が必要となるが、サイレージ中には多種多様な乳酸菌が混在しており、この中から優良菌株を選抜し、分類・同定するには長い時間と多大な労力を要する。さらに、*Lactobacillus plantarum* や *Lactobacillus casei* などのサイレージ内での主要菌群とされる乳酸菌の分類・同定は今なお論議が続いている。¹⁾

今回、高温多湿な西南暖地型気候に適応した優良サイレージ乳酸菌同定法の開発を述べ、その結果見えてきたサイレージ乳酸菌遺伝子の多様性と類似性について報告する。

rRNA 情報に基づくサイレージ乳酸菌の分類・同定

西南暖地型気候に適応したスターターとなりうる条件は、高温適応性、高乳酸生産性、高増殖性、耐酸性などが挙げられ、我々は上記の特性を有する菌株を各地のサイレージより分離した。²⁾ サイレージは材料草を滅菌せずに発酵に供するため、一種の混合培養となるが、発酵後期では *L. plantarum*, *L. casei*, *L. brevis* などの特定の乳酸桿菌が高頻度で検出される。このため、分離菌株について糖類発酵性試験、発酵形式、乳酸旋光性、ペプチドグリカンタイプ (DAP/ 非 DAP) 判定などの形態的・生理的特徴を上記のサイレージ優占菌株と比較したところ、すべてに一致するものは皆無であった。これらの特徴は培養条件に大きく依存し、必ずしも同一の結果が得られない場合が多いと言われており、³⁾ 性状による分類は不可能であると考えられた。

そこで、細菌の分子系統解析に用いられる 16S rDNA に注目し、特に乳酸菌では菌種によって保存性が異なるとされる V2-V3 region の塩基配列を解析した。⁴⁾ その結

果、すべての供試菌株が *Lactobacillus* 属に分類されたが、明瞭な同定は困難であったため、*Lactobacillus* 属の同定に有効な 16S-23S rRNA gene intergenic spacer region の塩基配列を解析した。この結果、供試菌株は *L. casei* グループと *L. plantarum* グループに大別できたものの、*L. plantarum* もしくは *L. pentosus* のような近縁種は、本遺伝情報を用いても正確な同定には至らず、また、数株は上記のグループとは異なる系統に分類され、種の同定は不可能であった。

RAPD-PCR に基づくサイレージ乳酸菌の分類・同定

上記の手法では困難な *L. plantarum* や *L. pentosus* のような近縁種の同定を可能にするために、RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) -PCR に注目した。この結果、プライマー AP-A-23 を用いた場合、基準株である *L. plantarum* JCM1149^T と *L. plantarum* JCM1057 では、共に約 1.4 kb と約 0.4 kb の位置に明瞭な増幅断片が認められた。一方、供試菌株でも同様な位置に増幅断片が認められるものが検出され、これらの株は、*L. plantarum* であると判定できた (図 1)。RAPD-PCR は簡便かつごく短時間で解析可能であることから、プライマーの設計を工夫することで容易にかつ短時間に乳酸菌の分類・同定が可能であると考えられた。

モノクローナル抗体を用いた免疫検出法による分類・同定

RAPD-PCR より特異的かつ高感度に同定する目的で抗 *L. plantarum* モノクローナル抗体と抗 *L. casei* モノクローナル抗体を用いた免疫検出法を行った。その結果、抗 *L. plantarum* 抗体では 6 株で陽性反応を示したが、*L. pentosus* JCM 1558^T も擬陽性反応を示したため、*L. plantarum* と *L. pentosus* を明瞭に分類することはできなかった。これは両菌種の表層タンパク質が非常に類似しているためであると推察した。次に、抗 *L. casei* 抗体を用いたところ、16S-23S rRNA gene intergenic spacer region の解析では同定が困難であった *L. casei* と *L. rhamnosus* 両株が分類できた。このことから、塩基配列で同定不可

* 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

4. 講演要旨

家蚕遺伝子開発分野

Bulletin of Sericult. Sci. of Kyushu

日蚕九州講演集 No. 5 (2004)

A02

大腸菌におけるリコンビナント キモトリプシンインヒビター b1 の 発現および精製

○何寧佳・藤井 博・日下部宜宏・麻生陽一・伴野 豊・山本幸治
(九大院農)

Kunitz 型キモトリプシンインヒビターはカイコ体液から数種が分離・精製され、そのアミノ酸配列ならびに遺伝子の塩基配列が明にされている。これらのインヒビターはそれぞれ別々の機能を担っていると考えられているが、生理機能に関しては、まだ解明されていない。我々は塩基性の CI-b1 に着目し研究を行っている。これまでの研究により、CI-b1 はカイコの自然免疫機構に関与する特異的な因子として働いていることが示唆された。しかしながら、生体内で、CI-b1 と作用する内在分子の存在に関しては不明である。そこで、内在分子の存在を *in vitro* で明らかにする目的で、N 末端にヒスチジンタグ付加したリコンビナント CI-b1(rCI-b1)を大量発現する大腸菌発現系の構築を試みた。Invitrogen 社の Gateway system を用いて、CI-b1 の遺伝子は LR 反応により発現ベクタ pDEST17 に挿入した。作製した発現ベクタ pDEST17-CIb1 を大腸菌 Origami B 株に形質転換し、IPTG により発現誘導した。(His)₆-tagged CI-b1 はタンパク質として高発現したが、封入体を形成した。そこで、6M Urea を加えることにより、封入体を可溶化することができた。可溶物を Sephacryl S-200 および Ni-NTA カラムを用いて電気泳動的に単一に精製した。その結果、200 ml の大腸菌培養溶液から約 4.3mg の rCI-b1 を精製できた。精製 rCI-b1 は、6 個のシステイン残基からなる 3 つのジスルフィド結合をもっていること、さらに α -chymotrypsin に対して阻害活性を示した。以上の結果から、生体内から得た CI-b1 とほぼ同一の性質を持つ rCI-b1 タンパク質を大腸菌から大量に得る系を構築することか出来た。

B01

ジヒドロリポアミド脱水素酵素 — 成熟型酵素の性質 —

○入江寿朗¹・重岡佑一¹・張平波¹・山本幸治²・伴野 豊²・

藤井 博²・麻生陽一²

(¹九大院生資環, ²九大院農)

ジヒドロリポアミド脱水素酵素 (Dihydrolipoamide dehydrogenase) は、ピルビン酸脱水素酵素など、いくつかの酵素複合体の共通な構成成分であり、E3 と略称される。また遊離 E3 の存在も知られ、生体内において多様な酸化還元反応を触媒することが示唆されている。しかしながら、昆虫由来の E3 については報告が少ない。我々は、カイコ (*Bombyx mori*) E3 の cDNA を分析し、カイコ E3 遺伝子が、ヒト E3 遺伝子と同様、N 末端にシグナルペプチドが付加されたプレカーサ型をコードしていることを明らかにした。さらに、プレカーサ型および成熟型 E3 遺伝子を大腸菌を用いて発現する系を構築した。本研究では、大腸菌を用いて得られた成熟型 E3 の諸性質を調べた。

N末端配列を調べたところ、メチオニンが開始コドンとして使われ、それに引き続く15残基が保全されていた。MALDI-TOF MSで得られた分子量は49,612であり、これは計算値49,570と近かった。ジヒドロリポアミドとNADを基質とする正反応、およびリポアミドとNADHを基質とする逆反応についてミハエリス定数を求めた。これら4つの基質いずれの場合も、ヒトE3の場合と類似の値であった。沈降速度法による超遠心で得られた沈降係数は、好熱菌 (*Bacillus stearothermophilus*) E3のものと同じであり、カイコE3は2量体であることが推測された。吸収スペクトルは450nmに吸収極大を示した。また、450nmの励起光による蛍光スペクトルは514 nmに極大を示した。これらのことは、カイコE3の補酵素がFADであることを示唆した。熱安定性を調べたところ、タンパク質濃度の増加とともに安定性が増した。このことは、2量体の解離が熱変性に寄与していることを示唆した。

B02

ジヒドロリポアミド脱水素酵素 —プレカーサ型酵素の調製—

○宮地希代子¹・入江寿朗¹・張平波¹・山本幸治²・伴野 豊²・

藤井 博²・麻生陽一²

(¹九大院生資環, ²九大院農)

ジヒドロリポアミド脱水素酵素 (E3) はビルビン酸デヒドロゲナーゼ酵素複合体の構成成分である。E3 は他のいくつかの酵素複合体の構成成分でもあり、また、遊離の状態でも生体中の酸化還元反応を触媒することから、その生理的機能に大きな興味を持たれる。E3 は2つのサブユニットから成るフラビントンパク質である。すなわち、1サブユニットにつき、1分子の補酵素 FAD が非共有結合的であるが、強く結合している。ほ乳動物や微生物の E3 については、古くからかなり良く調べられている。しかしながら、無脊椎動物、特に昆虫の E3 については、情報が少ない。我々は、カイコ (*Bombyx mori*) E3 の cDNA を分析し、それが N 末端 25 残基のシグナルペプチドを有するプレカーサ型 E3 (pE3) をコードしていると推測した。大腸菌で発現させた pE3 は封入体で得られる。そこで、本研究では、封入体を可溶化し、得られた標品の純度を調べ、さらに、成熟型 E3 と比較した。

封入体は Triton X-100 で洗浄した後、グアニジン塩酸塩 (GdnHCl, pH 7) で溶解し、透析によって GdnHCl を除くと白沈となった。予備実験から pE3 は酵素活性を有することが分かったので、活性を指標としてリフォールディング条件を検討した。ジチオスレイトール (DTT) 存在下、アルギニン、牛血清アルブミン (BSA)、及び FAD が酵素活性に及ぼす影響を調べた。アルギニンはむしろ活性の上昇を抑制し、BSA は大きな変化を与えなかった。さらに、活性の上昇は FAD 濃度に依存して増加し、4 日間つづくことが分かった。そこで、白沈を GdnHCl で再溶解し、FAD 及び DTT 存在下、迅速希釈した。最後に、透析によって FAD と DTT を除き、硫酸塩析で濃縮した。精製標品の純度を SDS ポリアクリルアミド電気泳動で調べたところ、1本のバンドが検出されたが、分子サイズは計算値よりもかなり大きかった。そこで、N末端アミノ酸配列 15 残基を確認した。また、マススペクトル分析を行った結果、分子サイズの差は 160 ダルトンまで近づいた。ペプチドマスフィンガープリンティング法により内部配列を確認した。成熟型 E3 と比較すると、その比活性は約 60%であるが、酵素活性の pH 依存性はほぼ同一であった。

B05

カイコ幼虫の絶食処理に伴う 体液タンパク質のプロテオミクス解析

○王永強^{1,2}・張平波³・藤井 博¹・伴野 豊¹・山本幸治¹・麻生陽一¹
(¹九大院農, ²中国・浙江農科院・蚕研所, ³九大院生資環)

カイコの体液タンパク質は組織の発育成長に伴う代謝活動を反映している。すなわち、体液タンパク質の濃度と成分が発育に伴って大きく変動することが既に報告されている。本研究は、絶食処理に伴う生理機能の変化をタンパク質レベルで明らかにするために、プロテオミクスを用いて 5 齢絶食幼虫の体液タンパク質成分の経時的変動について分析した。材料は九州大学農学部遺伝子資源研究センター保存の系統 p50 の雌個体を用いた。絶食処理：5 齢起蚕から 48 時間食桑させた後、絶食させた AS 区；72 時間食桑させた後、絶食させた BS 区；5 齢全齢期食桑させた対照 (CONT) を設定した。5 齢 2 日目から上簇まで毎日体液を採取し、それぞれのタンパク質量 (150ug) を二次元電気泳動で分離した。一次元目は固定化 pH 勾配等電点電気泳動システム (pH3-10, 18cm) を用いて、等電点電気泳動し、二次元目は 15% SDS-PAGE を行った。泳動後、タンパク質を銀染色し、PD-Quest 2D-ゲル分析ソフトウェアを用いて、AS, BS, CONT の 2-D パターン比較した。その結果、AS, BS と CONT 間で異なるスポットが認められなかった。次に、79 個のタンバクスポットについて濃度変化を経時的に解析した。濃度変化パターンを分類すると、28 個 (35.5%) は、AS が最も低いレベルを維持し、BS が CONT よりやや低いレベルで変化した。25 個 (31.6%) は、AS が CONT より高いレベル、BS がやや高いレベルで変化した。残りの 26 個 (32.9%) は、AS, BS と CONT とがほぼ同じ変動パターンであった。一方、pI 6.0-7.0, 分子量 30-40kD の範囲のタンパク質濃度が高く、CONT では発育に伴って増加傾向を示した。しかし、BS も増加するものの、CONT より低い増加率であったが、AS は明らかに低いレベルを維持した。さらに、営繭について比較したところ、BS では 50% 個体が営繭したが、AS では営繭する個体なかった。以上の結果から、26 個のスポットが基礎代謝と関連し、25 個スポットが絶食ストレスに関与するものであると考えられる。そして、既述の 30-40kD タンパク質の蓄積が幼虫変態に必要なと考えられる。今後、今回明らかにしたタンバクスポットを同定し、各スポット濃度変化パターンを解析することにより、さらに詳細な結果が得られると期待している。

A23

カイコにおける small heat shock protein に関する研究

○坂野大介¹・李 斌¹・張平波²・麻生陽一¹・山本幸治¹・

伴野 豊¹・藤井 博¹

(¹九大院農, ²九大院生資環)

我々は、これまでに 6 種類の sHSP 遺伝子の配列を解析し、完全長の塩基配列を決定した。その結果、ORF には 23.7, 21.4, 20.8, 20.4, 20.1, 19.9 kDa の sHSP がそれぞれコードされていた。21.4 kDa タンパク質を除く 5 種の sHSP では sHSP ファミリーに共通なドメインやシャペロン活性調節に重要な働きをするサブユニットの結合に関わる配列で保存性が高かった。さらに、熱ストレスに対する mRNA 発現量の変化について検討した。熱ストレスにより mRNA 発現量が増加した、しかしながら 21.4 kDa タンパクをコードする遺伝子の発現量は、変化しなかった。

熱ストレスにより mRNA 発現量が増加する sHSP は、一般的に細胞質内の他のタンパク質の成熟化や変性による凝集の阻害に関わっている、いわゆる分子シャペロンとしての働きをしていると考えられたので、熱変性したタンパク質の凝集を阻害するかどうかを指標にシャペロン活性を調べた。

20.8 kDa タンパクの N 末端に 6-His 配列を付加し、大腸菌で発現させた。この発現タンパク質は、60°C 以上の温度で BSA は熱変性による凝集を抑制することがわかった。また、発現タンパク質を精製し、抗原としてウサギに免疫し、ポリクローナル抗体を作製した。

クローニングした 6 種の sHSP タンパク質の存在をこの抗体を用いて確認する目的で 5 令 3 日の幼虫の脂肪体を試料とし免疫沈降した。15% SDS-PAGE, Western blot により解析したところ、20~30 kDa のタンパク質を複数検出した。6 種の sHSP は分子量が近似していることから SDS-PAGE 上では、検出されたバンドが 6 種の sHSP であるのかどうか区別できなかった。しかしながら、sHSP と相互作用するタンパク質の存在が示唆された。

A24

低分子量熱ショックタンパク質, Hsp20.8 に関する研究

○中村聖子¹・重岡祐一¹・坂野大介²・山本幸治²・伴野 豊²・

藤井 博²・麻生陽一²

(¹九大院生資環, ²九大院農)

近年, C 末端領域にレンズタンパク質 α -クリスタリンと相同性が高いドメインを有し, 比較的分子量の小さな熱ショックタンパク質 (Hsp) が広く存在することが知られるようになった。我々は, カイコ (*Bombyx mori*) には少なくとも 6 種の Hsp をコードする遺伝子が存在することを明らかにした。そのうち, 1 つを大腸菌で発現させ, 分子サイズ 20.8KDa の Hsp 20.8 を得た。本研究では, Hsp 20.8 のいくつかの性質について調べたので, 報告する。

高濃度の Hsp 20.8 標品からジヒドロリポアミド・デヒドロゲナーゼ (E3) 様の酵素活性を検出した。種々, 検討の結果, (1) 大腸菌 E3 が Hsp 20.8 と会合している, (2) 大腸菌 E3 が精製に用いた Ni-NTA 樹脂に親和性を持っている, (3) Hsp 20.8 自体が弱い酵素活性を持っている, という可能性が考えられたが, 明確な結論は得られなかった。さらに, Hsp 20.8 はクエン酸合成酵素の熱凝集 (45°C) を抑制することが分かった。様々な pH において Hsp 20.8 のトリプトファン残基の蛍光を調べたところ, pH に依存した構造変化が示唆された。そこで, 光散乱強度の変化を調べた結果, Hsp 20.8 の会合状態が変化していることが示唆された。さらに, 沈降速度法を用いて超遠心分析を行った。pH 5.1 に長期間さらすと, Hsp 20.8 は不可逆的に沈殿を形成することがわかった。また, pH8.0 では, Hsp 20.8 は, 既報の Hsp と同じく, 10 量体以上のサブユニット構造をしていると考えられた。

A25

免疫沈降による カイコ **small heat shock protein (sHSP)** の プロテオミクス解析

○張平波¹・坂野大介²・麻生陽一²・山本幸治²・伴野 豊²・藤井 博²

(¹九大院生資環, ²九大院農)

我々はカイコの分子量 12-43 kD の低分子量熱ショック蛋白質(small heat shock protein, sHSP) のストレス応答機構の解明を目指している。現在までに、6 種類の *sHSP* 遺伝子を同定し、その遺伝子構造、熱処理により誘導されるもの (5 種類) と誘導されないもの (1 種類) を明らかにした。しかし、カイコの細胞中に *sHSP* の存在を確認していない。そこで、本研究では 20.8kDa リコンビナント *sHSP* を抗原としたポリクローナル抗体を用いて、免疫沈降法で細胞・組織の中に *sHSP* の検出を試みた。免疫沈澱物を二次元電気泳動で分離し、マトリックスアシステッドレーザー励起イオン化 (MALDI) 飛行時間型質量分析計 (TOF/MS) で解析した。

供試蚕は九州大学農学部遺伝子資源開発研究センター保存の d43 系統である。産下後 20 時間後に浸酸処理をした卵と浸酸処理をしない卵を用いた。それぞれを磨碎し、遠心後の上清を用いて免疫沈降を行った。免疫沈澱物をバッファーに溶解し、二次元電気泳動法で分離した。すなわち一次元目は、IPGphor 等電点電気泳動システム (アマーシャムファルマシア) を用いてインゲル膨潤法に準じて行った。二次元目は、15% SDS - PAGE ゲル縦型電気泳動を行った。泳動後 TOF/MS 分析用の銀染色キットを用いてタンパク質を染色し、スポットを切り取り、5-10 ng/ μ l のトリプシンでインゲル消化を行った後、MALDI-TOF/MS を用いてペプチドマスフィンガープリント分析を行った。

その結果、二次元電気泳動後のゲルを銀染色したところ浸酸処理区は無処理区と同様に多数のスポットを検出したが、処理区のスポットの方が濃かった。そのうち 6 個のスポットは既に明らかにしたカイコ *sHsp* と一致した。それ以外に、 α -crystallin domain をもつタンパク質も同定した。このことから、カイコには同定した 6 種以外にも *sHsp* が存在することが示唆される。

一方、抗ウサギ IgG 抗体を用いウエスタンブロッティングを行ったところ、6 種の *sHSP* と α -crystallin domain をもつタンパク質は抗体と反応した。しかしながら、ウエスタンブロッティングでは検出されないが、銀染色で検出されるタンパク質は存在した。これらのタンパク質は *sHsp* と相互作用するタンパク質である可能性が考えられる。

A31

変態期中腸における キモトリプシンインヒビター CI-8 の 標的プロテアーゼ

○上野由宣¹・岡田太郎¹・伴野 豊²・山本幸治²・藤井 博²
(¹九大院生資環, ²九大院農)

幼虫中腸皮膜組織は変態期中腸内腔へ脱落し、その内腔で組織崩壊する。体液キモトリプシンインヒビター CI-8 は熟蚕期中腸皮膜へ、その膜上にある CI-8 結合タンパク質を介して取り込まれることから、CI-8 は中腸の崩壊過程に関与するものと推察できる。そこで、CI-8 の組織崩壊における中腸組織内の役割を明らかにするために、まず、その組織内の蓄積部位をウエスタンブロッティング、免疫組織化学を用いて解析した。

CI-8 は熟蚕期には中腸組織細胞質に蓄積し、ガットパージ後は中腸内腔液、蛹では中腸内腔に蓄積していることがウエスタンブロット分析の結果、明らかになった。蛹中腸内では特に、脱落した幼虫中腸組織の細胞質に蓄積していることが免疫組織化学的方法によって明らかになった。さらに、抗 CI-8 抗体を用いたウエスタンブロット法により、熟蚕中腸組織細胞質、ガットパージ後の中腸内腔液、蛹中腸内腔の脱落した幼虫中腸組織に CI-8 がプロテアーゼと結合した複合体と考えられる高分子の CI-8 抗原を検出した。この高分子抗原と同じ移動度の高分子が 35kDa プロテアーゼ、27kDa アルカリプロテアーゼ、カイコシステインプロテアーゼの抗プロテアーゼ抗体を用いたウエスタンブロット法でも検出された。この結果から、検出された高分子抗原は CI-8 がこれらのプロテアーゼと結合した CI-8-プロテアーゼ複合体であると考えられる。さらに、精製 CI-8 をガットパージ後の中腸内腔液に加えた結果、複合体の増加が各抗プロテアーゼ抗体を用いたウエスタンブロットで観察された。また、CI-8 とプロテアーゼの反応過程で生じる CI-8 の C 末端断片を質量分析で検出し、プロテアーゼとの反応に必要な CI-8 の活性中心を推定した。

以上の結果から、熟蚕中腸に蓄積した CI-8 はプロテアーゼの阻害を通して幼虫組織崩壊を制御すると考えられる。

A04

カイコ体液キモトリプシン インヒビター b1 に関する研究

○馮麗春¹・何寧佳²・藤井 博²・伴野 豊²・山本幸治¹
(¹中国・西南農大, ²九大院農)

カイコの体液中にはポリアクリルアミドゲル電気泳動で移動度の異なるキモトリプシンインヒビター (CI) が 16 種類存在することが知られている。これまでにいくつかについては遺伝子構造, 生理機能など詳細に研究されている。今回, カイコ体液中の 16 種の CI の中から特に塩基性タンパクである CI-b1 に注目し, その精製と諸性質の解明を試みた。

血球を除いた 5 齢幼虫体液から, 硫酸分画, ゲルろ過カラム, そしてイオン交換カラムにより精製した。精製 CI-b1 は電気泳動的に均一なタンパク質バンドを示した。

質量分析により CI-b1 の質量は 7061Da であることが分かった。また, pH 7.4 の条件下で 40°C~90°Cにおいて高い熱安定性を示した。そして, 室温に 24h 保温し, pH 安定性について調べたところ, pH 4-10 の範囲で 24h 後も安定であることが明らかとなった。次に CI-b1 の体液, 脂肪体, 卵巣, 絹糸線, 中腸における局在性を Western blot により解析したところ, 体液および卵巣に存在することがわかった。

339 ○桐生優子・徳永貴史・田崎三香子・竹本陽子・佐藤光(九大院農) イネ登熟種子中のアミロプラストの単離

Kiryu, Y., T.Tokunaga, M.Tasaki, Y.Takemoto and H.Satoh (Fac. Agr.,Kyushu U.) Isolation of amyloplasts from developing endosperm in rice.

【目的】穀類胚乳澱粉生成の遺伝的調節機構に関しては一応のモデルが提案されているものの、細胞質における基質合成系とアミロプラスト内の澱粉生成系の詳細、あるいは、アミロプラストの機能維持等に関わる因子など、多くの未解明な部分が残されている。貯蔵澱粉は穀物の収量や食味、加工特性と密接に関係し、これらの改良にはアミロペクチン局在タンパク質を含む澱粉生成関連酵素のより詳細な情報が不可欠である。本研究では、イネ胚乳中の澱粉生成関連酵素の細胞内局在を明らかにすることを目的として、胚乳細胞の分画を行ないアミロプラストの単離法を検討した。

【材料及び方法】供試材料には、イネ日本型品種「金南風」の登熟中期の胚乳を用いた。まず、登熟種子の種皮及び胚を除去し、得られた胚乳を0.8M ソルビトールを含む抽出 buffer に浸し、原形質分離させた。その後、カミソリを用いて buffer 中で胚乳を細かくスライスした。得られた細胞粗抽出液を Miracloth 4 層を通してろ過し、これを 100g で 10 分間遠心した。上清を Fig.1 に従って分画し、細胞質画分 (A) と細胞小器官画分 (B) とした。沈殿を破碎後、上清をアミロプラスト・ストロマ画分 (C) 及びその沈殿包膜画分 (D)、沈殿をデンプン画分 (E) に分画した。得られた各画分は SDS-PAGE に供試した。各細胞内画分のマーカータンパク質として、シヨ糖合成酵素 (細胞質)、13a プロラミン (細胞小器官画分) 及び澱粉枝作り酵素 II b (アミロプラスト) 抗体を用いて Western blot 分析を行った。

【結果及び考察】SDS-PAGE 電気泳動の結果、各画分で特異的なタンパク質が検出された。そこで、マーカータンパク質に対する抗体を用いて Western blot 分析を行った。細胞質に存在することが確認されているシヨ糖合成酵素は、細胞質画

分 (A) 及び細胞小器官画分 (B) に見出された。一方、ER に局在することが明らかとなっているプロラミンは細胞小器官画分 (B) に強い発現が認められた。アミロプラストに局在する澱粉枝作り酵素 II b は細胞質画分には殆ど認められず、アミロプラスト画分、特にデンプン画分及びストロマ画分に強い発現が認められた。これらの結果から、本法を用いたアミロプラストの単離及び胚乳細胞の分画は、イネ胚乳中の澱粉生成関連酵素の細胞内局在を明らかにする有効な手段と考えられる。

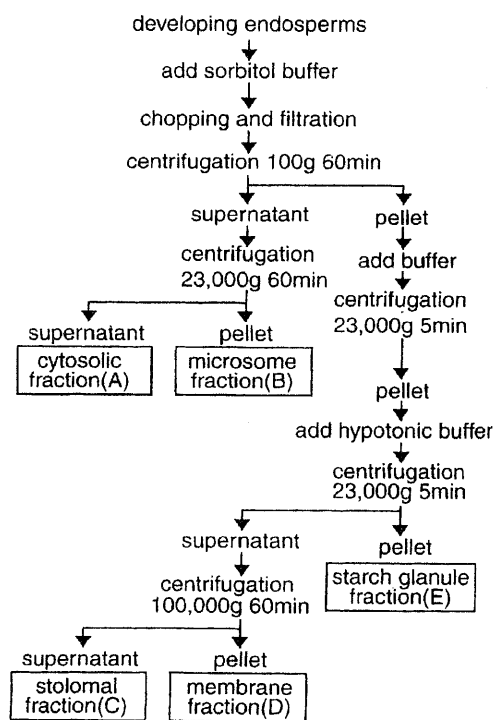


Fig. 1. Isolation of amyloplasts with differential centrifugation of developing endosperm cells of rice.

340 ○徳永貴史¹・柴原賢介¹・西愛子¹・中村保典²・大坪研一³・佐藤光¹(1. 九大院農, 2. 秋田県立大生物資源科学, 3. 食総研) イネ胚乳種子中のスターチホスホリラーゼの同定及び細胞内局在
Tokunaga, T.¹, K. Shibahara¹, A. Nishi¹, Y. Nakamura², K. Ohtsubo³ and H. Satoh¹ (1. Fac. Agr., Kyushu. U., 2. Fac. Biores. Sci., Akita. U., 3. N.F.R.I) Localization of starch phosphorylase from developing endosperm in rice

【目的】スターチホスホリラーゼ(SPH) はグリコーゲン及び澱粉の合成を行う酵素として見出され、合成と分解の両反応を触媒することが知られている。しかし、現在ではSPHは合成よりもむしろ分解に関与すると考えられている。イネ登熟種子中にSPHの強い活性が認められている(Yamanouchi and Nakamura, 1992)。しかしSPHの細胞内局在や機能は明らかでない。本研究ではSPHの機能解明を目的として、本酵素の細胞内局在並びにアミロプラストに局在する澱粉生成関連酵素の発現を特異的に抑制する*flo2*変異の解析を行った。

【材料及び方法】材料には水稻品種「台中65号」(TC65)及びMNU受精卵処理によって得た*flo2*変異体EM554を用いた。SPHの発現は、イネ登熟種子、葉、葉鞘及び稈を用いてYamanouchi and Nakamura (1992)の手法に従ってNative-PAGE/活性染色法により解析した。胚乳特異的SPHの同定は、Native-PAGE/CBB染色後、対応するバンドを切り出し、SDS-PAGEにて部分精製し、質量分析計を用いたアミノ酸分析により行った。SPHの細胞内局在は、TC65登熟種子を用いて、桐生ら(2004)の手法に従って細胞質画分、アミロプラスト画分に分画後、SDS-PAGE及びWestern blot分析により調査した。*flo2*変異がSPH発現に及ぼす効果は、変異体登熟種子を用いてNative-PAGE/活性染色法により分析した。

【結果及び考察】Native-PAGE/活性染色分析の結果、登熟種子胚乳に移動度の異なるSPH-S及びSPH-Fの

2種類の活性バンドを確認した(図1)。SPH-Sは全ての組織において検出された。一方、SPH-Fはイネ登熟種子胚乳でのみ見出された。このことは、SPH-Fは胚乳特異的に発現することを示している。SPH-Fを単離し、アミノ酸分析を行った結果、既報のイネ並びに他の穀類のSPHと90%以上の相同性を示した(図2)。登熟種子胚乳を分画後、細胞質画分並びにアミロプラスト画分についてSDS-PAGE分析及び抗SPH-F抗体を用いてWestern blot分析を行った結果、SPH-Fはアミロプラスト画分に検出され、本酵素はアミロプラストに局在することが示された。

*flo2*変異体登熟種子を用いたNative-PAGE/活性染色分析の結果、SPH-Sは殆ど変化が認められないのに対してSPH-Fは著しく減少した。以上より、SPH-Fは胚乳特異的で、かつアミロプラストに局在することから、澱粉合成に関与する可能性が考えられた。

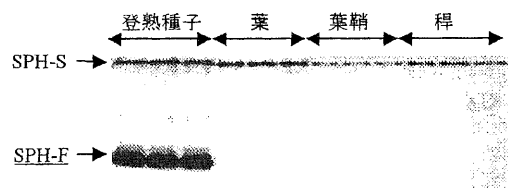


図1 各組織におけるSPHのNative-PAGE/活性染色分析

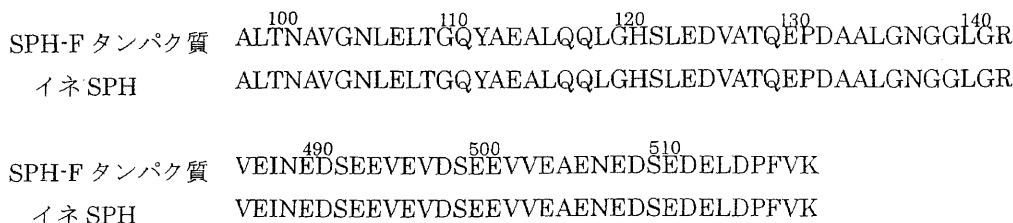


図2 SPH-Fタンパク質と既報のイネSPHのアミノ酸配列の相同性

341 ○上田悠加¹・竹本陽子¹・佐藤美緒¹・熊丸敏博¹・田中國介²・大坪研一³・小川雅広⁴・佐藤 光¹ (1. 九大院農、2. 京都府立大農、3. 食総研、4. 山口県立大生活科学) イネグルテリン前駆体を集積する *glup7* 変異体胚乳細胞の組織学的解析

Ueda, Y. ¹, Y. Takemoto¹, M. Sato¹, T. Kumamaru¹, K. Tanaka², K. Ohtsubo³, M. Ogawa⁴ and H. Satoh¹ (1. Fac. Agr. Kyushu U., 2. Fac. Agr. Kyoto P. U., 3. N F R I, 4. Fac. Human Life Sci. Yamaguchi P. U.) Histochemical analysis of PBs in endosperm cells of developing seed for a novel 57H mutant, *glup7*, in rice

【目的】イネ種子貯蔵タンパク質グルテリンは、小胞体(ER)上で 57 kD グルテリン前駆体として合成された後、液胞由来のプロテインボディⅡ (PBⅡ) に輸送され、限定分解を受けて成熟型グルテリンとなり蓄積する。グルテリンの輸送・蓄積経路の遺伝的制御機構の解明のため、グルテリン前駆体を多く蓄積する 57H 変異体を選抜し、これまでに 9 遺伝子座を同定した。*Glup7* 遺伝子は、遺伝分析の結果から、ER 内でグルテリン前駆体とプロラミンの分別に関与する遺伝子の下位に位置することが示された。そこで、グルテリンの輸送・蓄積経路における *Glup7* 遺伝子の機能解明を目的とし、当該変異体に集積するグルテリン前駆体の胚乳細胞内局在を調査した。

【材料及び方法】MNU 処理によって得た *glup7* 変異体 CM935 及び原品種「金南風」の登熟種子を用いた。グルテリン前駆体の細胞内局在を明らかにするため、PB のシヨ糖密度勾配 (SDG) 遠心分離で分画を行った。PB の観察は、登熟種子を高圧急速凍結固定法によって固定包埋し、透過型電子顕微鏡で行った。免疫標識は一次抗体にグルテリン及びプロラミン抗体を使用した。

【結果及び考察】SDG 遠心分離の結果、*glup7* 変異体に蓄積するグルテリン前駆体は、ほぼ全ての画分に分布し、PBⅠと同じ画分にピークが認められた。この結果から、*glup7* 変異体のグルテリン前駆体はプロラミンと同一 PB 内に局在するか、グルテリン前駆体が PBⅠと比重を同じくする顆粒に局在することが考えられた。

そこで、グルテリン前駆体の細胞内局在を明らかにするため、電子顕微鏡観察を行った。*glup7* 変異体胚乳細胞内に、PBⅠ及び PBⅡに加えて ER 内に直径約 1 μm 以下で表面のなめらかな電子染色性の弱い顆粒 (Inclusion bodyⅠ) と電子染色

性の強い顆粒 (Inclusion bodyⅡ) が観察された (Fig.1)。グルテリン抗体を用いて免疫標識をしたところ、PBⅡ及び Inclusion bodyⅡのみが標識され、プロラミン抗体では PBⅠ及び Inclusion bodyⅠのみが標識された。このことは、*glup7* 変異体で ER 内に観察された 2 種の顆粒は、それぞれグルテリン前駆体及びプロラミンを集積していることを示している。グルテリン前駆体とプロラミンはそれぞれ異なる Inclusion body を形成し、既報の *esp2*、*glup4*、*glup6* 変異体のように同一の顆粒内に混在していないことから、*glup7* 変異体では、両タンパク質の ER 内分別は正常に機能していることが示唆された。

以上の結果より、*glup7* 変異では (1) グルテリン前駆体は PBⅡ への輸送が阻害されたことにより ER 内に集積し、結果としてプロラミンの PBⅠの形成にも影響を与えた、もしくは、(2) プロラミンが正常な PBⅠを形成せずに ER 内に集積することがグルテリン前駆体の PBⅡ への輸送を阻害したと推察される。

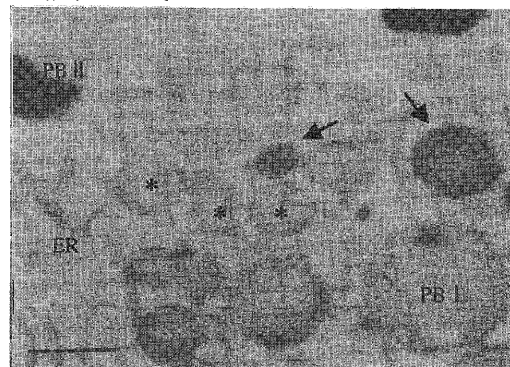


Fig.1 Electronmicrograph of the developing *glup7* endosperm. Two types of inclusion body different in staining intensity in ER lumen were observed.

Arrow : Inclusion bodyⅠ * : Inclusion bodyⅡ
(Bar= 1 μm)

342 ○竹本陽子¹・上田悠加¹・佐藤美緒¹・熊丸敏博¹・田中國介²・大坪研一³・小川雅広⁴・佐藤光¹
 (1.九大院農、2.京都府立大農、3.食総研、4.山口県立大生活科学) イネグルテリン前駆体を集積する *Glup5* 変異体胚乳の組織学的解析

Takemoto, Y.¹, Ueda, Y.¹, Sato, M.¹, Kumamaru, T.¹, Tanaka, K.², Ohtsubo, K.³, Ogawa, M.⁴ and Satoh, H.¹

(1. Grad. Sch. Agr., Kyushu U., 2. Fac. Agr., Kyoto P.U., 3. N. F. R. I., 4. Fac. Life Sci., Yamaguchi P.U.)

Histochemical analysis of developing endosperm cells of a novel 57H mutant, *Glup5*, in rice.

【目的】真核細胞では小胞体(ER)上で合成されたタンパク質は、小胞輸送によって各々の細胞小器官へ輸送される。イネ種子貯蔵タンパク質グルテリンも同様に、ER で前駆体として合成された後、小胞によって集積器官である液胞に輸送されるが、その詳細については未だ不明である。グルテリン前駆体の細胞内小胞輸送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蓄積する 57H 変異体を作成した。それら 57H 変異の一つ *Glup5* について組織学的に解析した。

【材料及び方法】水稻品種「台中 65 号」を MNU 処理することによって誘発した突然変異体 *Glup5* (EM675)を材料に用いた。*Glup5* に集積する 57kD ポリペプチドの解析は、グルテリン抗体を用いたウエスタンブロット分析により行った。胚乳組織内のグルテリン前駆体の存在状態は、シヨ糖密度勾配 (SDG) 遠心分離法によるプロテインボディ (PB) の分画及び 3 種の溶媒 (0.5M NaCl, 60% n-propanol / 5% 2ME, 1% lactic acid) を用いた溶解特性により推定した。電子顕微鏡観察は化学固定した開花後 15 日の登熟種子をグルテリン抗体及びプロラミン抗体により標識し行った。遺伝子間相互作用の解析には、57H 変異遺伝子系統との交配 F2 種子を用いた。

【結果及び考察】*Glup5* は、57kD ポリペプチドが増加し成熟型グルテリンがわずかに減少するが、プロラミンの染色程度及び組成は野生型とほぼ同一であった。ウエスタンブロット分析の結果、*Glup5* の種子胚乳に蓄積する 57kD ポリペプチドはグルテリン前駆体であることが明らかになった。これらの結果は、*Glup5* はグルテリン前駆体の輸送蓄積のみが阻害される変異体であることを示している。

溶解特性解析の結果、*Glup5* のグルテリン前駆体はプロラミンとは独立して集積することが示唆された。SDG 遠心分離の結果、*Glup5* の前駆体は PB I 及び PB

II よりも比重の軽い画分に分布した。この結果は、*Glup5* のグルテリン前駆体は PB I 及び PB II とは異なる新たな PB に蓄積する、もしくは既報の *Glup1* 及び *glup2* と同様に ER 内で前駆体が小顆粒を作って集積している可能性を示している。

電子顕微鏡観察の結果、*Glup5* では正常型の PB I 及び PB II に加え、表層部に激しい凹凸のある電子染色性の高い *Glup5* 型 PB が見いだされた (Fig.1)。*Glup5* 型 PB の表層にはポリゾームが認められたが、その分布は著しく不均一であった。免疫標識の結果、*Glup5* 型 PB はグルテリン抗体でのみ標識された。これらの結果から、*Glup5* のグルテリン前駆体は ER 由来の変異型 PB に集積することが明らかになった。

遺伝子間相互作用解析の結果、*Glup5* 遺伝子は、ER 内におけるグルテリン前駆体とプロラミンの分別に作用すると考えられるグループ 1 (*esp2*, *glup4*, *glup6*) の下位に位置し、ER からの輸送に関与すると考えられるグループ 2 (*Glup1*, *glup2*, *glup7*, *Glup8*) 及びグルテリン前駆体の液胞内成熟に関与するグループ 3 (*glup3*) と相加的に作用することが示された。

以上の結果は、*glup5* 遺伝子がグルテリン前駆体の ER からの輸送を制御する可能性を示している。

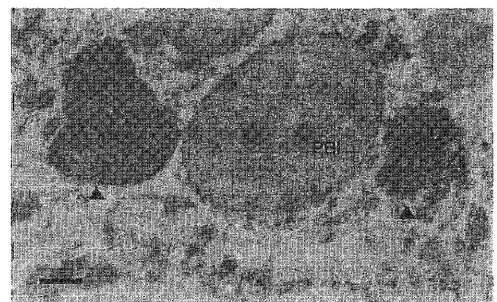


Fig.1 Electron microscopic observation of PBs in developing endosperm of EM675 (*Glup5*).

▲: *Glup5* type PB Bar=500nm.

403 ○佐藤 光¹・波多江裕子¹・西 愛子¹・竹本陽子¹・上村裕二¹・中村保典²・久保亜也子²・桜井 彩²

・大坪研一³ (1.九大院農, 2.秋田県大生物資源, 3.食総研) イネ胚乳中の澱粉枝作り酵素 IIa に関する変異体の作出
Sato H¹, Y. Hatae¹, A. Nishi¹, Y. Takemoto¹, U. Uemura¹, Y. Nakamura², A. Kubo², A. Sakurai² and K. Ohtsubo³ (1. Fac. Agr., Kyushu U., 2. Fac. Biores. Sci., Akita Pre. U., 3. Natl. Food Res. Inst.) Isolation of a mutant for starch branching enzyme IIa in rice

【目的】アミロペクチンはイネ胚乳澱粉の 85%を占め、米飯の食味や加工特性に大きく影響する。従ってアミロペクチン生合成に関わる遺伝子変異の開発は、イネの成分育種にとって主要な課題の一つである。澱粉枝作り酵素 (BE) はアミロペクチン α 1,6 分枝形成に関わる唯一の酵素で 3 種のアイソザイム、BEI、BEIIa 及び BEIIb が存在する。BEI 及び BEIIb のアミロペクチン分枝形成に果たす役割はある程度解明されているが、BEIIa に関しては不明な部分が多い。そこで BEIIa の機能解明を目的として、変異体の作製と特性解析を行った。

【材料・方法】材料には、水稻品種「金南風」及びその MNU 受精卵処理によって得た BEIIa 変異体 EM19 を用いた。BEIIa 活性は、登熟種子を用いた Native-PAGE/活性染色法によって分析した。Western blot 分析は、BEIIb 抗体を用いて行った。アミロペクチン鎖長分析は、キャピラリー電気泳動法によって行った。デンプンの糊化特性は、DSC を用いて解析した。遺伝様式並びに遺伝子の同定は、印度型品種「Kasalath」と EM19 の F3 集団について、*Os-BEIIa* プロンプを用いた RFLP 分析によって行った。BEIIa 遺伝子内の変位部位の解析は、EM19 葉身より DNA を調整後、DNA シークエンサーを用いて行った。

【結果及び考察】乳熟期登熟種子の Native-PAGE/活性染色分析を行ったところ、EM19 では BEIIa 活性が野生型の 1/16~1/32 以下に低下していた (Fig.1)。また、移動度が野生型より若干大きかった。一方、BEI 及び BEIIb 活性は、野生型と殆ど変わらなかった。BEIIb 抗体を用いた Western blot 分析の結果、EM19 では BEIIa 発現量は野生型と殆ど変わらないが移動度が異なることから、本変異体は BEIIa 構造遺伝子のミッセンス変異の可能性が示唆された。そこで、野生型との正逆交配を行い、発現パターンを調査したところ顕著な遺伝子量効果が認められた。トリソミック分析の結果、本変異体遺伝子 *sbe2m* は、*Os-BEIIa* 遺伝子と同じく染色体 4 に座乗することが明らかとなった。さらに、「Kasalath」と EM19 の交配後

代について RFLP 解析を行ったところ、*Os-SBEIIa* 遺伝子と *sbe2m* 遺伝子間に完全連鎖が認められた。本変異体遺伝子の変異部位解析を行ったところ、cDNA 内に 1946G→A の塩基置換が見出され、アミノ酸配列では第 13 エクソン内で 499Gly→Asp へと置換していた。変異部位は、本酵素が有する 3 種のアミラーゼドメインの 2 番目の活性中心の近傍にあり、中性アミノ酸から酸性アミノ酸への変異が、活性の低下と Native-PAGE における移動度の変化をもたらしたものと考えられる。

sbe2m 変異体玄米の粒型や粒重、澱粉蓄積量は野生型とほぼ同等で、外観にも差異は認められなかった。また、アミロース含有率もほぼ同等であった。アミロペクチン鎖長分布は、野生型に比べ若干短鎖が増加する傾向は認められるものの、有意な差異は認められなかった。これに対して、糊化特性は大きく異なり、野生型に比べ糊化熱量が著しく増大した。さらに、BEIIb を欠損する *ae* 変異体澱粉と同様、糊化開始温度や糊化終了温度が高くなる傾向が認められた。これらの結果は、BEIIa がアミロペクチン結晶構造形成に関与することを示唆している。

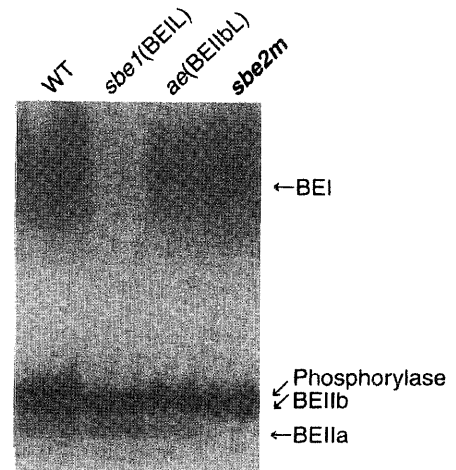


Fig.1 Native-PAGE/Activity staining analysis of BEs in developing seeds of three kinds of rice BE mutants

533 ○田崎三香子¹、田中康昌¹、上村裕二¹、熊丸敏博¹、中村保典²、大坪研一³、佐藤 光¹ (1.九大院農、2.秋田県大生物資源科学、3.食総研) イネ胚乳粉質変異 *flo3* 遺伝子のマッピング

Tasaki, M.¹, Y. Tanaka¹, Y. Uemura¹, T. Kumamaru¹, Y. Nakamura², K. Ohtsubo³ and H. Satoh¹ (1.Fac. Agr. Kyushu U., 2.Fac. Biores. Sci., Akita Pre. U., 3.NFRI) Mapping of *flo3* gene in rice seed

【目的】イネ胚乳粉質変異 *flo3* は、澱粉蓄積量を著しく減少させることから、澱粉生合成に関与する遺伝子の変異と考えられる。*flo3* 遺伝子は染色体6上に *wx-v3 -C-flo3-st1 -chl4 - drp6* で連鎖し(山下ら、2000)、イネの可溶性澱粉合成酵素 IIa (SS IIa) の構造遺伝子とほぼ同位置にあると考えられた。本研究では *flo3* 遺伝子の機能解明を目的として、*flo3* 遺伝子と SS IIa 遺伝子の異同並びにマッピング、*flo3* 変異が澱粉特性及び澱粉生合成関連酵素の活性に及ぼす影響について調査した。

【材料及び方法】1) SS IIa 遺伝子との異同の検定及びマッピング：材料にはインディカ型品種「Kasalath」と MNU 受精卵処理によって得た *flo3* 変異体 EM557 の交雑 F₂ 集団より *flo3* 遺伝子ホモ個体 (70 個体) を選抜し、SS IIa 遺伝子に特異的なプローブを用いて、RFLP 連鎖分析を行った。

2) *flo3* 変異の特性解析：日本型水稻品種「金南風」及び「台中 65 号」、両品種の MNU 受精卵処理によって得た *flo3* 変異体、EM4、EM557、EM591、EM608、及び *wx* 変異体 EM21、*flo3/wx* 二重変異体 AMF75 を用いた。SS IIa 及び ショ糖合成酵素構造遺伝子 *SUS1* の発現は、ノーザンブロット法を用いて解析した。*flo3* 変異がタンパク質の発現量に及ぼす影響を、登熟種子及び完熟種子の SDS-PAGE により分析した。*flo3* 変異体の胚乳澱粉生合成関連酵素の発現を、①Starch Synthase (SS) 及び澱粉枝切り酵素 (PUL) は登熟種子の Native-PAGE/活性染色分析、②澱粉枝切り酵素 I (BE I) 及びショ糖合成酵素 (SUS) は登熟種子の SDS-PAGE/ウェスタンブロット分析によって行った。澱粉蓄積量、アミロース含量、アミロペクチン鎖長分布及び澱粉糊化特性は既報の手法で解析した。

【結果及び考察】ノーザンブロット分析及び Native-PAGE/

活性染色分析の結果、*flo3* 変異は SS IIa 遺伝子の発現並びに SS IIa 活性には影響を及ぼさないことが示された。そこで、両遺伝子の連鎖解析を行った結果、両者は異なる遺伝子であり、両遺伝子間の組換え価は 6.4% であることが明らかとなった。既報の結果を考慮すると、*flo3* 遺伝子は SS IIa 遺伝子の短腕側 6.4cM に位置すると考えられる (図.1)。

flo3 変異は澱粉蓄積量を野生型の約 50% (mg/粒) に減少させるが、アミロペクチン鎖長分布を含め、その他の澱粉特性に顕著な効果は示さなかった。このことから、*Flo3* 遺伝子は澱粉構造よりもむしろ基質など澱粉合成の量的要因に関わるものと推察される。

flo3 変異体の登熟種子及び完熟種子の SDS-PAGE 分析を行ったところ、82kD 及び 100kD 両タンパク質の発現量の減少が認められた。同様の分子量を有する澱粉生合成関連酵素のタンパク質量及び活性について調査した結果、PUL(100kD)、BE I (82kD) は野生型と大差は認められなかった。しかし、SUS(80-82kD) の発現量は低下していた。そこで、染色体6に座する *SUS1* のプローブを用いて、ノーザンブロット分析を行ったところ、正常量の発現が認められた。また、*flo3* と *SUS1* の RFLP 連鎖分析を行ったところ、両者は異なる遺伝子であることが明らかとなった。

以上の結果を基に、Rice Genome Research Program 上の Rice Genome Automated Annotation system (<http://ricegaas.dna.affrc.go.jp/>) で検索を行ったところ、短腕側から 31.4cM 近傍に、ショ糖合成酵素と相同性の高い2遺伝子 (*SUS* ホモログ1、*SUS* ホモログ2) が存在し、両者のいずれかが *flo3* 遺伝子である可能性が示唆された (図.1)。

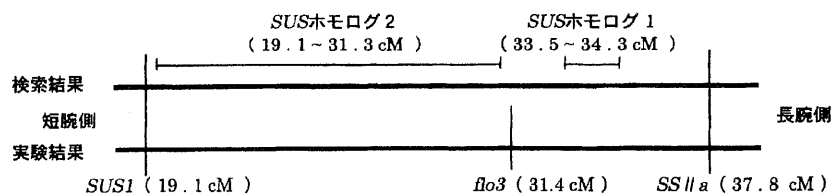


図.1 *flo3* 遺伝子の座乗位置

2004年度 日本農芸化学会大会 (広島)

2A06p23 *Bacillus licheniformis* No. 161の硝酸還元能に関わるnarオペロンの構造・機能解析

○土居 克実、川原 優佳¹、大桃 定洋²、緒方 靖哉³ (九大院農院・遺資工、¹九大院生資環・遺資工、²農水省・国際農研セ、³崇城大工・応微工)

【目的】 *B. licheniformis* No. 161は強力な硝酸還元能を示す。本株の硝酸還元に関わる遺伝子構造と機能を明らかにすることを目的とした。

【方法及び結果】 No. 161株の硝酸および亜硝酸還元能について、基準株である *B. licheniformis* JCM 2505^T株および *B. subtilis* 168株と比較したところ、両株より非常に優れていることが示された。そこでNo. 161株の硝酸還元に関わる遺伝子構造を168株と比較したところ、No. 161株には168株に類似したオペロン構造 (*narG*, *narH*, *narJ*, *narI*) と *ywiC*, *ywiD* 遺伝子が存在した。しかし、No. 161株では *ywiD* と *narG* 間に補酵素ピロロキノリンキノン生合成タンパク質 (PQQ) と高い相同性を示す *orf1158* が存在した。168株の染色体上にも、PQQ様タンパク質をコードする遺伝子が他部位に存在していたが、*orf1158* と有意な相同性は認められず、*orf1158* は古細菌類のPQQと高い相同性を示したことから、本ORFが両株の硝酸還元能の違いに関連すると推察した。

2A07p08 *Thermus* 属細菌のシリカ鉱物化作用に関わるシリカ誘導タンパク質の特性

土居 克実、稲垣 史生¹、○緒方 靖哉² (九大院農院・遺資工、¹海洋科技セ・地殻内微生物、²崇城大工・応微工)

(目的) 地表にできる非結晶性シリカ鉱物は地熱湧水地帯で形成され、地熱発電所の熱水を循環させるパイプ等の設備にも極めて短時間に多量沈着して発電を妨げている。我々は好熱性細菌がシリカ鉱物化に関与することを *in vitro* 培養系で証明した。¹今回、シリカ鉱物化に深く関与する好熱菌のタンパク質の構造と特性を推定したので報告する。

(方法・結果) 地熱発電所のシリカ沈殿物から分離した *Thermus thermophilus* に近縁の *Thermus* sp. TMY株は、メタケイ酸ナトリウムを溶解させた *in vitro* 培養系で、対数増殖期中期から過飽和分のポリマーを短時間で著しく沈殿させる。本培養系から菌体を回収後、SDS-PAGEを行ったところ、35 kDaの細胞表面タンパク質の著しい産生が認められた。本タンパク質は過飽和シリカの存在によって誘導されることから Sip (Silica-induced protein) と命名した。内部アミノ酸配列を基に解析したところ、Sipは *T. thermophilus* HB8の Ferric iron-binding periplasmic protein に類似すると推定された。¹Appl. Microbiol. Biotechnol. 60 605 (2003)

O-3.2 (P-3.16)

**Purification and characterization of antimicrobial substance
KPA26 from thermotolerant
Pediococcus acidilactici L0026 against
both Gram positive and Gram negative bacteria**

Sunee Nitisinprasert¹, Jitlada Jintaroon¹, Pungjai Bunyeun¹, Takeshi Zendo², Katsumi Doi³, Jiro Nakayama² and Kenji Sonomoto².

¹Department of Biotechnology, Faculty of Agro-Industry, Kasetsart University, Thailand
²Laboratory of Microbial Technology, Department of Bioscience and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Kyushu University and ³Microbial Genetics Division, Institute of Genetic Resources, Faculty of Agriculture, Graduate School, Kyushu University.

Pediococcus acidilactici KUB-L0026 was isolated from silage in Thailand. This strain was preliminary tested for antimicrobial activity against *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* and *Salmonella* Typhimurium. The antimicrobial substance (AMS) obtained was partially inactivated by 1 mg/ml pepsin and α -amylase for 18 h. This indicated that it was bacteriocin like substance with high enzymatic toleration. In this study, purification of AMS and its characteristics were presented. The AMS was concentrated and partially purified by the pH mediated cell adsorption-desorption method. The optimization condition for both adsorption and desorption of AMS to the cell were performed at various pH and incubation times resulting in pH 7.0, 4 h and pH 1.5, 18 h, respectively. Then, the active fractions were collected and further purified by reversed-phase HPLC. The purification was increased to 60.8-fold but only 0.025% was yielded. When it was subjected to SDS-PAGE analysis, the molecular mass of a distinct band of 16 kDa, designated "KPA26" was determined. The AMS KPA26 was active at pH 2 - 6 and stable when heat-treated at 100 and 121°C for 15 min. This compound inhibited several food-borne pathogens and spoilage bacteria, including *B. cereus*, *B. subtilis*, *E. coli*, *M. luteus*, *S. Enteritidis*, and *S. Typhimurium*. Mode of action of KPA26 was bactericidal activity against both *B. cereus* SL-BC1 and *S. Enteritidis* S003 which were Gram positive and Gram negative, respectively. With the properties of heat stable, enzymatic toleration and bactericidal activity, KPA26 would be a promising antimicrobial substance applied for food and feed safety in the future.

Thermotolerant enterocin SE-K4, an anti-listerial bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* K-4 isolated from silage in Thailand

Katsumi Doi¹⁾, Sunee Nitisinprasert²⁾ and Seiya Ogata³⁾

¹⁾ Department of Genetic Resources Technology, Faculty of Agriculture, Graduate school, Kyushu University, 6-10-1 Hakozaki, Fukuoka 812-8581, Japan, ²⁾

Department of Biotechnology, Faculty of Agro-Industry, Kasetsart University, 50 Paholyothin Rd., Chatuchak, Bangkok 10900, Thailand. ³⁾ Department of Applied Microbial Technology, Faculty of Engineering, Sojo University, Kumamoto 860-0082, Japan.

Enterococcus faecalis strain K-4, isolated from silage in Thailand, produced heat stable bacteriocin, designated enterocin SE-K4, a class IIa bacteriocin. The molecular mass of enterocin SE-K4 was 5356.2 and its N-terminal end showed apparent sequence similarity to class IIa bacteriocins¹⁾. Enterocin SE-K4 was active against *E. faecium*, *E. faecalis*, *B. subtilis*, *Clostridium beijerinckii* and *Listeria monocytogenes*. Production of enterocin SE-K4 was depended on culture condition such as temperature and medium composition. Especially, maximum activity of enterocin SE-K4 was obtained with addition of Tween 80 to MRS broth at 42°C.

E. faecalis K-4 carries two plasmids, pEK4S (approximately 60 kb) and pEK4L (approximately 75 kb). Plasmid-curing experiments showed that pEK4S was involved in the production of and immunity to enterocin SE-K4 in strain K-4. A derivative strain, M6, with pEK4S produced a higher amount of enterocin SE-K4 than the parental strain K-4, although its growth rate was lower than that of parental strain K-4²⁾. Phenotypic changes in strain M6 are attributed to an increase in plasmid copy number. The genetic determinants of enterocin SE-K4 were located in 3.3-kb *EcoRI-SalI* fragment of pEK4S (AB092692). This region was cloned and sequenced. It contains the SE-K4 structural gene plus six open reading frames (ORFs) (*orf1*, *orf2*, *orf4*, *orf8*, *orf9* and *orf10*) and three putative ORFs transcribed in the opposite direction (*orf3*, *orf5* and *orf7*). The gene *orf6* translated as a 76-amino-acid residue mature protein of enterocin SE-K4. The *orf1*, *orf2*, *orf4*, *orf5* and *orf9* showed homology with ORFs in plasmid pYI717. The products of *orf7* and *orf9* could be proteins with 79 and 90 residues of enterocin precursor and immunity protein, respectively. The product of *orf8* shows strong homology in its N-terminal domain to *orf6* products, enterocin SE-K4.

¹⁾ Eguchi et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **64** (2), 247-253 (2001)

²⁾ Doi et al., *J. Biosci. Bioeng.*, **93** (4), 434-436 (2002)

第191回RISTフォーラム

「西南暖地型気候に適応したサイレージ乳酸菌の開発 ～環境負荷低減と安全性の向上を目指して～」

平成16年12月16日

九州大学大学院農学研究院 講師

土居 克実

第191回RISTフォーラム

西南暖地型気候に適応した
サイレージ乳酸菌の開発
～環境負荷低減と安全性の向上を
目指して～

九州大学大学院 農学研究院
遺伝子資源工学部門

土居克実

乳酸菌(Lactic Acid Bacteria; LAB)
とは?

革陽性細菌
球菌形形成性
非芽胞形成性
非運動性
球状または棒状の形態
フェーズ陰性(通性嫌気性)
ほとんどもはヘテロ発酵性

消費した糖(グルコースなど)に対し、50%以上の乳酸を生成する

2

乳酸発酵

ホト型乳酸発酵
 $C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2C_3H_6O_3$
乳酸

ロ型乳酸発酵
 $C_6H_{12}O_6 \rightarrow C_3H_6O_3 + C_2H_5OH + CO_2$
エタノール 炭酸ガス

ヒフィズス菌の乳酸発酵
 $2C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2C_3H_6O_3 + 3CH_3COOH$
酢酸

3

乳酸菌の属

Leuconostoc属,
Pediococcus属,
Streptococcus属,
Lactobacillus属,
Meliococcus属,
Cyzosillus属

Streptococcus属,
Lactococcus属,
Genococcus属,
Cubidium属,
Vesicella属,
Lactosphaera属,
Cetococcus属,
Abiotrophia属,
Paralactobacillus属,
Granulicatella属,
Atopobacterium属,
Alkalibacterium属,
Olsenella属

S. thermophilus
(チーズ生産菌)

4

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

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

何 寧佳（中国西南農業大学校教員）

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

王 永強（浙江省農業科学院蚕業研究所研究員）

カイコ中腸におけるタンパク質の動的変化に関する研究

馮 麗春（中国西南農業大学校教員）

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

李 斌（中国西南農業大学校教員）

カイコの熱ショックタンパク質に関する研究

易 発平（重慶医科大学教員）

カイコのプロテオーム解析

外国人来訪者

司馬 揚虎（中国、蘇州大学）

N. S. Reddy (インド、Dalamaner Chiftore)

K. S. Chandrakanth (インド、Central Sericultural Research Institute)

B. Rudrappa (インド、Central Sericultural Research Institute)

【植物遺伝子開発分野】

大学院生物資源環境科学研究科（博士課程）

佐藤美緒 イネ種子貯蔵タンパク質の小胞体における選択的分別の遺伝的制御機構

牛島智一 イネ種子貯蔵タンパク質プロラミンの生合成・集積に関わる変異体の遺伝学的研究

Phan Thi Diem Chi

ベトナム在来イネ品種の遺伝資源学的研究

大学院生物資源環境科学研究科（修士課程）

上田悠加 グルテリンの細胞内輸送に関する変異体の探索とその遺伝学的研究

桐生優子 イネ*flo1*変異体の遺伝学的研究

田崎三香子 イネ登熟種子中のショ糖代謝に関わる変異体の遺伝学的研究

徳永貴史 イネの胚乳特異的ホスホリラーゼに関する遺伝学的研究

井原康晴 イネ胚乳中の細胞質局在型ADP-glucose pyrophosphorylase small subunitに関する遺伝学的研究

大窪郁 イネ胚乳におけるProtein Body Iへのプロラミン集積に関する基本的研究

小濱悠人 アミロプラスト局在AGPaseに関する変異の作製と特性解析

藤井聡子 イネの胚乳中のデンプン枝作り酵素と特異的に反応するデンプン分解酵素に関する研究

Hoai Evaluation of seed reserve in Vietnam rice genetic resources

【微生物遺伝子開発分野】

大学院生物資源環境科学府（博士課程）

村田匡礼 無細胞糖タンパク質合成系の開発

大学院生物資源環境科学研究科（修士課程）

小森裕子 電界を利用した糖タンパク質合成装置の開発

酒井博司 *Streptomyces azureus*のバシトラシン誘導性ABCトランスポーターの解析

藤 良江 サイレージ乳酸菌の分子育種

平山直樹 *Streptomyces azureus*の溶原性ファージSA_{t2}ゲノムの構造解析

2. 科学研究費・共同、受託研究等

【家蚕遺伝子開発分野】

五峯ライフサイエンス国債基金
「カイコのプロテオミクスに関する研究」

農林水産省受託研究
21世紀最大の未利用資源活用のための「昆虫テクノロジー研究」

文部科学省
ナショナルバイオリソースプロジェクト「カイコ」

【植物遺伝子開発分野】

科学研究費

基盤研究（A）（2）研究代表 佐藤 光、分担 熊丸敏博
「イネ胚乳アミロペクチンの分枝構造の遺伝的変換に関する基礎的研究」

基盤研究（B）（2）研究代表 熊丸敏博、分担 佐藤光
イネ種子プロラミンのプロテインボディへの集積機構の解明

受託研究

ナショナルバイオリソース中核的拠点整備プログラム
「イネ遺伝資源実験システムの収集・保存・提供と基礎データ蓄積」

農林水産省受託研究 研究代表 熊丸敏博
「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」

福岡県産官学共同研究開発事業 代表 佐藤 光、 分担 熊丸敏博
「県育成酒米品種を用いた福岡オリジナル清酒の開発」

共同研究

秋田県立大学 中村保典
「イネのアミロペクチン変異体の特性解析」

ワシントン州立大学. 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】

科学研究費

基盤研究(B) 分担 土居克実
「東南アジアにおける乳酸菌資源の学術調査及びデータベースの構築」

受託研究

(株)三菱レーヨン 原敏夫

「生分解性吸水性材料の開発」

平成 16 年度経済産業省大学発事業創出実用化研究開発事業 代表 原敏夫

「多目的コンポスト化システムの開発」

平成 16 年度経済産業省中小企業庁中小企業・ベンチャー支援事業（実用化研究開発事業） 代表 原敏夫

「納豆樹脂を活用したアトピー性皮膚炎患者向け保湿剤の開発」

武田科学振興財団研究奨学金 代表 土居克実

「放線菌プラスミドの転移と宿主阻害に関与する遺伝子発現の時間的・空間的解析」

共同研究

台湾大学

「納豆菌利用技術開発に関する研究」

味丹公司（台湾）

「PGA発酵生産技術の確立と事業化」

(株)丸美屋

「納豆製造技術の開発とその新展開」

(株)三菱レーヨン

「生分解性吸水性材料の開発」

カセサート大学アグロインダストリー学部 Sunee Nitisinprasert

「熱帯地域での乳酸菌遺伝子資源の探索と利用」

海洋科学技術センター 稲垣史生

「深海域での新規遺伝子資源の探索」

崇城大学生物生命学部 緒方靖哉、九州大学大学院理学研究院 横山拓史

「高度好熱菌のシリカ沈殿機構の解明」

3. 講演会・セミナー・講習会

【家蚕遺伝子開発分野】

平成16年7月

山本幸治、伴野豊、藤井博.

「*Bombyx mori*抗酸化酵素（カタラーゼならびにスーパーオキシドジスムターゼ）のクローニングとその発現解析」第28回タンパク質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム

平成16年9月

藤井 博

「ナショナルバイオリソースプログラム「カイコ」基調講演」日本発カイコルネッサンス公開シンポジウム&ワークショップ

平成16年9月

伴野 豊

「カイコ突然変異体の概要とその特性」
日本発カイコルネッサンス公開シンポジウム&ワークショップ

平成16年9月

伴野 豊

「初心者にカイコのABC教えます」日本発カイコルネッサンス公開シンポジウム&ワークショップ、東京大学

平成16年9月

Yamamoto, K.

“Antioxidant defense in the silkworm, *Bombyx mori*.”
Core Silkworm Research Institution of China and Japan, Chongqing, China.

平成16年10月

山本幸治

「*Bombyx mori* 抗酸化酵素（カタラーゼならびにスーパーオキシドジスムターゼ）の同定とその発現解析」昆虫の体色多形性発現および斑紋形成に潜む分子メカニズム解明への挑戦

【植物遺伝子開発分野】

平成16年8月

熊丸敏博

「イネにおけるグルテリンの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」 A look beyond plant storage/植物貯蔵の先に見えるもの

平成16年11月

佐藤 光

“Mutation in endosperm reserves and its utilization for improving the grain quality in rice” World Rice Research Conference

平成17年3月

佐藤 光

「イネデンプン変異体の単離と特性解析 ～アミロペクチン構造変換に関する遺伝学的アプローチ～」

「澱粉代謝研究の新展開」日本植物生理学会

平成17年3月

佐藤 光

「デンプンメタボリックエンジニアリングの可能性」 イネの胚乳澱粉特性に関わる遺伝子資源の開発 日本農芸化学会大会

【微生物遺伝子開発分野】

平成16年5月

原敏夫

「ウルトラ吸水性を有する納豆樹脂の開発」 日本材料学会九州支部創立40周年記念講演会

平成16年6月

原敏夫

「納豆の糸から納豆樹脂の開発とその応用展開」日本材料学会複合材料部会特別講演

平成16年6月

原敏夫

「未来への挑戦—納豆の糸からウルトラ吸水性ポリマーの開発—」 向陽学園橘香館
出張講義

平成16年6月

土居克実

「サイレージ乳酸菌の機能開発 ～サイレージにおけるバイオプリザベーションの
利用～」日本生物工学会乳酸菌工学研究部会講演会

平成16年7月

土居克実

「放線菌プラスミドの転移と宿主阻害に関する遺伝子発現の時間的・空間的解析」
日本放線菌学会2004年度大会 受賞講演会

平成16年7月

原敏夫

「大学発ベンチャーが納豆樹脂でブレイクできるか？」九州地域バイオベンチャーフ
ォーラム

平成16年10月

原敏夫

「放射線を利用した納豆樹脂の開発とその応用展開」九州地区放射線主任管理者講
習会

平成16年10月

原敏夫

「納豆樹脂の開発とその応用分野」北九州エコテクノ2004 出展

平成16年12月

原敏夫

「納豆の糸から納豆樹脂の開発とその応用展開」日本海ポリマーワークショップ
2004

平成16年12月

土居克実

「微生物遺伝子から見えるものは何か ～医療、食糧から環境、宇宙まで～」第44
回 弘前大学遺伝子実験施設セミナー

4. 海外渡航

【家蚕遺伝子開発分野】

藤井 博 中華人民共和国
2004年9月23日～30日
西南大学「学術講演並びに研究交流」

山本幸治 中華人民共和国
2004年9月23日～30日
西南大学「学術講演並びに研究交流」

西坂章文 中華人民共和国
2004年9月23日～30日
西南大学「学術講演並びに研究交流」

【植物遺伝子開発分野】

佐藤 光 アメリカ合衆国、(ワシントン州立大学)
2004年8月17日～ 8月28日
基盤研究A(2)「情報収集と調査研究」

熊丸敏博 アメリカ合衆国、(ワシントン州立大学)
2004年12月9日～12月16日
基盤研究 (B)「情報収集と学術研究」

【微生物遺伝子開発分野】

原 敏夫 台湾
2004年7月27日～7月29日
「PGA発酵生産プロセスの開発」

台湾
2004年11月2日～11月7日
「PGA発酵生産プロセスの開発」

土居克実 クロアチア共和国
2004年8月31日～9月6日
「日本 - クロアチア科学技術交流ワークショップ参加」 科学技術振
興機構委託

カンボジア王国
2004年11月28日～12月2日
「JDS留学生（九州大学受入分）現地面接及びカンボジア王国 教育
研究機構視察」 日本国際協力センター

タイ王国、中華人民共和国
2005年3年13日～3月23日
「アジア地域における新興・再興感染症およびそれを巡る研究動向
調査」 科学技術振興機構

5. 学会賞受賞

【微生物遺伝子開発分野】

土居克実 日本放線菌学会 浜田賞 受賞

IV. 遺伝子資源系統の保存・管理

遺伝子資源系統の分譲・収集

【家蚕遺伝子開発分野】

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

p (地域型品種)	18	a (胚子, 幼虫期致死)	18
b (繭形・繭質)	17	c (繭色)	26
d (卵形・卵殻色)	30	e (卵色)	28
f (幼虫肢・斑紋)	37	g (幼虫斑紋)	16
i (幼虫眼紋・頭尾斑)	13	k (幼虫体色)	23
l (幼虫体色)	28	m (モザイク・畸形)	16
n (幼虫体形)	26	o (油蚕)	35
r (染色体異常・交叉率)	15	t (発育・眠性)	22
u (蛹・成虫)	20	w (連関分析用合成系)	27
x (分析未了の新突然変異)	13		

このほか淘汰育成中のもの並びに各種実験系があるが、これらは大文字の記号を用いて区別しており、ここには記載しない。以下、各保存系統について解明された遺伝情報のほか、交配形式、起源及び導入元・発見・交雑の年次など主要な必要事項を記載する。蛋白質、酵素、染色体組成に関する情報の多くは本研究班によって解明されたものである。記載様式は系統番号、交配形式（染色体構成）、卵・幼虫・繭・蛹・成虫の遺伝形質、備考として起源・品種・交雑系統及び主要形質の誘発処理源、入手先、年次の順であるが、特記事項のない項目については省略する。また、例えば $w-3^{oo}$ では白卵、幼虫皮膚透明（油蚕）、蛹・成虫の複眼白色、と種々の発育段階で変異形質を発現するが、このような場合には“卵”の項にのみ記載している。交

雑によりはじめて認知され得る形質、蛋白質・酵素等の多型、未淘汰の混在系、致死性により正常を常に分離するもの、等については（ ）内に記号で記入し、特殊形質を標識するための計画的分離形質は&で併記している。また、L、ms 等については発現環節番号を（ ）内に示す。尚、交雑系統は原則として現番号で表示し、現有しないものについては品種名或いは大文字の記号を用いた。他機関からの受入系統は主形質の起源を能う限り記したが、出現から導入までの経緯は定かでない。例えばa80系統 {起源 春月系 (カネボウ, ×w31×w32×I90, 1985年)} はカネボウから春月系交雑種に生じた*Hi*を分離する系の分譲を受け、これに本センターでw31, w32さらにI90系統を1985年に交雑し*Xan*を標識形質として導入した育成系統であることを示す。遺伝子情報の概要は「家蚕遺伝子資源系統の特性情報増補第2版- 1998- Genetical stocks and mutations of *Bombyx mori*: important genetic resources」に記載している。

(分譲)

大沼 昭夫 (蚕業技術研究所)	n06, t30
小川 洋子 (元東京大学)	a60, a61
盧 時甲 (慶北大学 (韓国))	c58, c10, c15, d90, l20
土田 耕三 (厚生労働省感染症研究所)	FL50 (5回) FL501 (5回)
天竺桂弘子 (東京農工大学)	FL50、FL501, L21, L22
嶋田 透 (東京大学)	t32
藤原晴彦 (東京大学)	i21, g01, g32, Fw-2
中山光育 (香蘭女子短期大学)	Fre

飯田（東光小学校）	交雑種
古澤寿治（京都工芸繊維大学）	80系統（詳細省略）
一田昌利（京都工芸繊維大学）	f40, l70
河本夏夫（農業生物資源研究所）	e01, e02, e03, e04, e05, r02, w14, w16
清水 進（学内）	p20, p21, p22, p24, p50, p61, p62, c40, d18, e15, k01,
高橋 進（山口大学）	d32
神崎亮平（筑波大学）	p50（10回）
G.Chavancy（国際養蚕委員会（フランス））	b50
佐原 健（北海道大学）	クワコ（地域別）
中島裕美子（琉球大学）	クワコDNA（地域別）
前川秀彰（厚生労働省感染症研究所）	クワコDNA（地域別）
Peter Andolfato（トロント大学（カナダ））	クワコDNA（地域別）

【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。2002年より、文部科学省ナショナルバイオリソース中核的拠点整備プログラムのサブセンターとして、栽培イネ実験系統群について特性情報の高度化と充実、再現性・安定性の高い高品質素材の供給を図るとともに、円滑な提供を実施できる体制の整備を開始した。

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

HO系統	国内外の品種系統	1,398 系統
LO系統	1962-1965年収集したわが国在来品種	1,341 系統
TAL系統	中国在来品種・系統	476 系統
IBP系統	FAO 国際共同研究供試品種	276 系統
R系統	Lo系統と同時期に収集した県奨励品種	515 系統
UP系統	国内外の陸稲品種	342 系統
A系統	長崎原爆被曝再生株より採種した系統	100 系統
FL系統	標識遺伝子系統	838 系統
RT系統	転座系統	331 系統

T系統	三染色体植物系統	44 系統
M系統	放射線照射突然変異系統	178 系統
CM系統	化学変異源処理突然変異系統	4,477 系統
EM系統	胚乳形質に関する突然変異系統	1,392 系統
		計11,708系統

これら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
2004		1-27		15-2280	1-6

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98株

(B) 分離株 *Bacillus*属、*Lactobacillus*属、*Lactococcus*属、*Pediococcus*属、*Pseudomonas*属、*Enterococcus*属及び*Thermus*属 1110株

(C) 変異株 *Bacillus*属、*Lactobacillus*属および*Thermus*属 15種59株

II. 放線菌

(A) 基準株 *Micromonospora*属、*Nocardia*属、*Rodococcus*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365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 130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 105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 149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 51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。

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.	
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

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

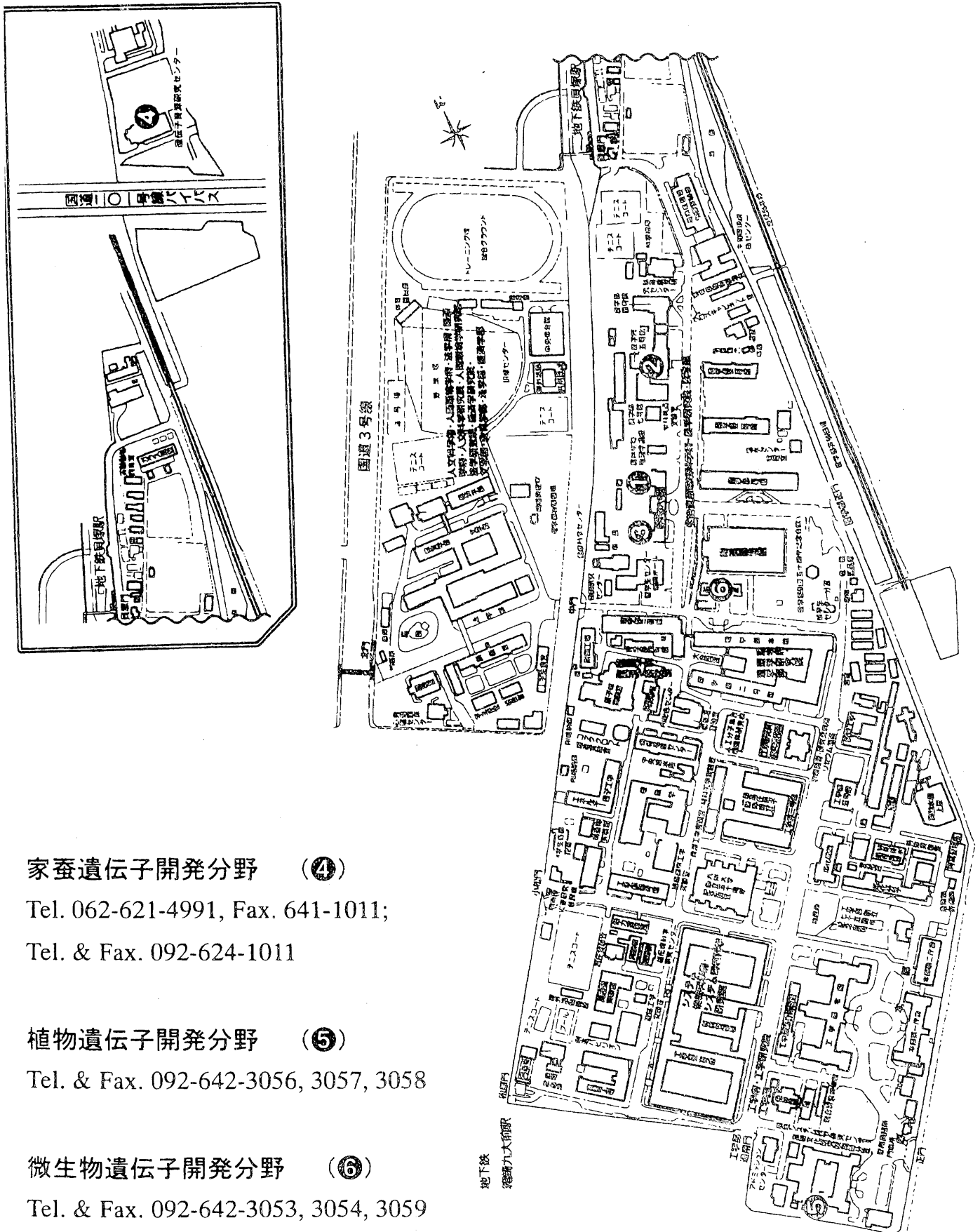
- a) Collection, evaluation and preservation of rice genetic resources
- b) Mutagenesis and mutation spectrum in rice
- c) Genetic analysis of induced mutants in rice: Starch, protein and lipid stored in grain
- d) Genome analysis of the useful genes in rice
- e) Isozyme variation in rice, barley and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

Microbial Genetics Division

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



家蚕遺伝子開発分野 (4)

Tel. 062-621-4991, Fax. 641-1011;

Tel. & Fax. 092-624-1011

植物遺伝子開発分野 (5)

Tel. & Fax. 092-642-3056, 3057, 3058

微生物遺伝子開発分野 (6)

Tel. & Fax. 092-642-3053, 3054, 3059

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 8 号

平成 2 0 年 2 月 2 9 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

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